VISIT…

LANZAROTE
Caliente.com

Иммуно-ферментный анализ









Издательство «Мир»

Enzyme-mediated immunoassay

Edited by
T. T. Ngo and H. M. Lenhoff
University of California, Irvine
Irvine, California

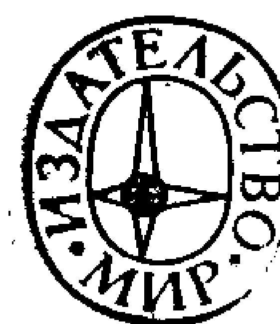
Plenum Press. New York and London

Иммуно-ферментный анализ

Под ред. Т. Т. Нго, Г. Ленхоффа

Перевод с английского
канд. хим. наук С. В. Калугера,
канд. хим. наук А. Л. Остермана

под редакцией
д-ра биол. наук А. М. Егорова



Москва «Мир» 1988

ББК 28.072
И 53
УДК 577.15.08

Иммуноферментный анализ: Пер. с англ./Под ред.
И53 Т. Нго и Г. Ленхоффа — М.: Мир, 1988. — 446 с., ил.

ISBN 5—03—000191—3

Фундаментальное руководство по иммуноферментному анализу, сочетающее изложение принципов метода с подробным обсуждением практического использования его различных вариантов. Авторы отдельных разделов — исследователи, работающие в США, Канаде и Швейцарии, известны своим вкладом в разработку и применение метода; книга написана на высоком профессиональном уровне и содержит много новых данных.

Для специалистов по молекулярной биологии, биохимиков, микробиологов, биотехнологов.

И $\frac{2001040000—295}{041(01)—88}$ 135—88, ч. 1 ББК 28.072

Редакция литературы по биологии

ISBN 5—03—000191—3 (русск.)
ISBN 0—306—42085—6 (англ.)

© 1985 Plenum Press, New York
© перевод на русский язык, «Мир», 1988

Предисловие редактора перевода

Иммуноферментный анализ, возникший более пятнадцати лет назад на пересечении иммунохимии и инженерной энзимологии, стал в настоящее время одним из распространенных методов исследования. Явные преимущества нового метода, к которым относится простота выполнения, доступность и стабильность реагентов, экспрессность и возможность автоматизации для проведения массовых анализов, обеспечили его прочное положение в клинической биохимии, при диагностике заболеваний растений и животных, в научных исследованиях. Благодаря успехам биотехнологии иммуноферментный анализ далее интенсивно развивался, поскольку с помощью генной инженерии были получены в высокоочищенном виде малодоступные антигены, а также ферменты-маркеры и их конъюгаты с антигенами, а с помощью клеточной инженерии — моноклональные антитела с заданной специфичностью и аффинностью. Новые направления развития иммуноферментного анализа связаны с использованием различных методов регуляции ферментативной активности при детектировании комплексов антиген — антитело. Именно этим вопросам и посвящена предлагаемая книга.

Если весь процесс иммуноферментного анализа условно разделить на три основные стадии: формирование специфического комплекса антиген — антитело (иммунохимический процесс), введение в него метки и ее визуализация тем или иным физическим способом, то можно заметить, что основное внимание в данной книге фокусируется на второй и третьей стадиях, представляющих преимущественно энзимологический аспект проблемы. В книге рассмотрены практически все известные способы регуляции активности ферментов, как химические (с помощью активаторов, ингибиторов, субстратов, простетических групп), так и физические (путем изменения активности ферментов при образовании комплекса антиген — антитело, с помощью ультразвука, конформационных и диффузионных ограничений). Главное достоинство монографии состоит в том, что в ней, по-видимому, впервые комплексно рассмотрены возможности регуляции активности ферментов, которые могут быть использованы для создания методов иммуноферментного анализа. В этом смысле оправдано английское название книги «Enzyme-mediated immunoassay», которое буквально переводится, как «Иммунный анализ, опосредованный через ферменты».

Представленные в книге главы написаны ведущими специалистами в области иммуноферментного анализа, работающими в исследовательских центрах фирм и университетов США, Канады и Швейцарии. Вместе с тем в книге чувствуется единство научного подхода и дух творчества, внесенные в нее редакторами Нго и Ленхоффом. Последние сами являются ав-

торами многих оригинальных новаторских идей в области использования ферментов для иммунохимического анализа.

Следует обратить внимание читателей на те основные тенденции развития иммуноферментного анализа, которые прослеживаются в представленной книге: сокращение времени анализа и упрощение методик благодаря переходу к гомогенным методам анализа; применение двойных меток (два фермента, фермент и якорная группа и т. д.), которые повышают специфичность детектирования ферментной метки; использование моноклональных антител и множественный антигенный анализ для повышения специфичности иммунохимической стадии детектирования. Принципиально новым является создание методов иммунохроматографии, в которых концентрация вещества определяется не по активности ферментного конъюгата, а по его хроматографической подвижности.

При подготовке русского издания трудность представлял перевод некоторых терминов, не имевших эквивалента в научной литературе на русском языке. Поэтому в ряде случаев мы вводили новые термины, которые с нашей точки зрения достаточно точно отражают смысл процесса. Следует отметить, что сами авторы употребляют иногда отнюдь не общепризнанные термины, а также много произвольных сокращений. Для того чтобы облегчить их восприятие, в конце книги мы приводим список сокращений. Большое количество экспериментального материала, методик, аналитических характеристик разных методов иммуноферментного анализа делают данную книгу ценным пособием как для тех, кто разрабатывает новые методы анализа, так и для тех, кто использует уже готовые диагностические наборы и хочет знать, по какому научному принципу они составлены.

В настоящее время за рубежом имеется несколько изданий [1, 2], в которых рассматриваются различные аспекты иммуноферментного анализа. Тем, кто только начинает знакомиться с этим методом, мы рекомендуем сборник статей [3], который послужит введением в проблему.

Данная монография представляет большой интерес для широкого круга читателей-энзимологов, иммунохимиков, биотехнологов, врачей, которым важно не только то, что она содержит обширную информацию, но и то, что она способна стимулировать дальнейшие исследования. Не все новые идеи, которые представлены в данной книге, нашли свое практическое применение, однако, в ней убедительно показаны безграничные возможности дальнейшего развития данного направления иммуноанализа.

А. М. Егоров

Литература

1. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Practice and theory of enzyme immunoassays. P. Tijssen, ed., Elsevier Science Publishing Co., New York, NY, 1985, 549 pp.
2. Methods of enzymatic analysis. Third Edition. H. U. Bergmeyer, ed., Verlag Chemie, v. 1, 9, 10, 11, 12, 1983—86.
3. Журнал Всесоюзного химического об-ва им. Д. И. Менделеева. Ред. Р. В. Петров, И. В. Березин, А. М. Егоров, 1982, т. 27, № 4.

Введение

Т. Т. Нго, Г. М. Ленхофф

В 1959 г. Ялоу и Берсон разработали количественный иммунологический метод определения инсулина в плазме человека с использованием инсулина, меченного радиоактивным изотопом йода. Предложенный метод основан на конкуренции между немеченым инсулином плазмы и ^{131}I-инсулином за постоянное и ограниченное число специфических мест связывания на антителах к инсулину. Количество меченого инсулина, связавшегося с антителами, обратно пропорционально количеству инсулина в образце плазмы. Метод, столь простой и изящный по своему замыслу, удалось осуществить благодаря легкости измерения предельно низких уровней радиоактивности, а также благодаря высокой специфичности связывания определяемого вещества антителами. Сочетание чувствительности и специфичности составляет основу этого гибкого аналитического инструмента, названного радиоиммунологическим анализом (РИА).

Двенадцать лет спустя Энгвалл и Пэлманн (Engvall, Perlmann, 1971) и независимо от них Ван Веемен и Шуурс (Van Weemen, Schuurs, 1971) ввели в употребление другой тип чувствительных и еще более универсальных меток для иммуноанализа — ферменты. Энгвалл и Пэлманн (Engvall, Perlmann, 1971) предложили сокращенно называть этот анализ ELISA (от англ. Enzyme Linked Immunosorbent Assay), что означает фермент-зависимый иммуносорбционный анализ.

Как в случае РИА, так и в случае ELISA сначала отделяют меченые и немеченые антигены, связавшиеся с антителами, от свободных антигенов и только потом измеряют активность метки в одной из двух фракций. Такие методы относят к иммуноанализу с разделением компонентов. Поскольку фракционирование анализируемой смеси неизбежно предполагает использование гетерогенных фаз, иммуноанализ с разделением компонентов часто называют гетерогенным иммуноанализом.

В 1972 г. Рубенштейн и др. разработали новый вид иммуноферментного анализа, не требующий перед измерением ферментативной активности разделения связанных с антителами и свободных антигенов. Метод основан на изменении удельной активности фермента при связывании антител с антигенами, содержащими ферментную метку. Ферментативная активность нефракционированной анализируемой смеси пропорциональна количеству меченных ферментом антигенов, не связавшихся с антителами. При таком анализе гетерогенные фазы для разделения связанных и свободных антигенов не требуются, поэтому его называют гомогенным иммуноанализом. Мы считаем, что термин «гомогенный» не совсем точно отражает характерные признаки метода, и предлагаем более подходящий и более наглядный термин — иммуноанализ без разделения компонентов. Лучше употреблять именно этот термин, поскольку некоторые варианты иммуноферментного анализа без разделения компонентов не являются гомогенными и предполагают наличие гетерогенных фаз (см., например, гл. 8 и 10).

С тех пор, как ферменты в 1971 г. впервые были предложены в качестве меток для иммуноанализа, появилось более 10 000 публикаций, посвященных различным аспектам применения иммуноферментного метода. Эта книга включает обзоры, написанные североамериканскими авторами и отражающие уровень современных достижений в развитии иммуноферментного анализа. Сборники обзоров, написанных европейскими (Avrameas et al., 1983; Malvano, 1980) и японскими (Ishikawa et al., 1981) исследователями, были изданы раньше.

Литература

Avrameas S., Druet P., Masseyeff R., Feldmann G., Eds., 1983. Immunoenzymatic Techniques, Elsevier Science Publisher, Amsterdam.

Engvall E., Perlmann P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Quantitative assay of immunoglobulin G, Immunochem., **8**, 871—874.

Ishikawa E., Kawai T., Miyai K., Eds., 1981. Enzyme Immunoassay, Igaku-Scoin, Tokyo.

Malvano R., Ed., 1980. Immunoenzymatic Assay Techniques, Martinus Nijhoff Publisher, The Hague.

Van Weemen B. K., Schuurs A. H. W. M. (1971). Immunoassay using antigen—enzyme conjugate, FEBS Letters, **15**, 232—236.

Yalow R. S., Berson S. A. (1959). Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods, Nature, **184**, 1648—1649.

Глава 2

Иммуноферментный анализ: общий обзор

Т. Т. Нго

Введение

Радиоиммунологический анализ (РИА), предложенный Ялоу и Берсоном (Yalow, Berson, 1959), значительно ускорил важные открытия в области биомедицинских наук и превратился в стандартный инструмент лабораторных исследований в медицине. В наши дни стало обычной практикой проведение миллионов клинических анализов с использованием РИА. Быстрое и широкое признание РИА в качестве рутинного клинического метода можно объяснить: 1) его универсальностью: РИА позволяет определять любое соединение, против которого получены специфические антитела; 2) избирательностью и специфичностью; 3) чувствительностью определения радиоактивных изотопов, выполняющих функцию метки в РИА; 4) простотой проведения анализа и интерпретации результатов.

Наряду с преимуществами РИА обладает и некоторыми недостатками. К ним относятся: а) сравнительно короткий период полураспада изотопов, испускающих γ-кванты; б) опасность для здоровья, которую представляют введение изотопных меток, подготовка и выполнение анализов; в) повреждение структуры меченых молекул, вызываемое излучением; г) необходимость отделения меченых и немеченых антигенов, связавшихся с антителами, от свободных антигенов и д) обусловленная этим трудность автоматизации РИА.

Стремление найти замену радиоактивным меткам и разработать способы иммуноанализа без разделения компонентов привело к использованию ряда неизотопных меток. Среди них можно назвать: бактериофаги (Haimovich, Sela, 1969), свободные радикалы (Leute et al., 1972), флуоресцентные красители (Soini, Hemmila, 1979), хемилюминесцентные и биолюминесцентные вещества (Simpson et al., 1979; Kricka, Carter, 1982; Serio, Pazzagli, 1982), искусственные полимерные частицы (Rembaum, Dreyer, 1980), эритроциты (Adler, Liu, 1971), вещества, сильно рассеивающие электроны (Singer, Schick, 1961; Leuvering et al., 1980), липосомы (Chan et al., 1978; Litchfield et al., 1984), металлы (Cais et al., 1977), субстраты ферментов (Burd et al., 1977; Wong et al., 1979; Ngo et al., 1979; Ngo et al., 1981; Ngo, Wong, 1985), простетические группы (Ngo, 1985), модуляторы ферментов (Ngo, Lenhoff, 1980a; Ngo, 1983; Ngo, 1985) и ферменты (см. обзоры по этой теме: Schuurs, Van Weemen, 1977; Borrebaech, Mattiasson, 1979; Ngo, Lenhoff, 1981; Ngo, Lenhoff, 1982).

Фермент-зависимые метки

Фермент-зависимые метки (ФЗМ) — это вещества, которые можно количественно определять с помощью ферментативных реакций. К ФЗМ относятся субстраты, кофакторы, простетические группы, модуляторы ферментов (т. е. ингибиторы или активаторы), фрагменты ферментов, апоферменты и ферменты.

Преимущества ФЗМ

Использование ФЗМ в иммуноанализе дает следующие преимущества: 1) устойчивость меченых соединений при длительном хранении: период полуинактивации ФЗМ при 4 °С, как правило, превышает шесть месяцев; 2) возможность быстрого определения концентрации ФЗМ при помощи общедоступных приборов, имеющихся в большинстве аналитических лабораторий; 3) отсутствие радиационной опасности; 4) возможность разработки легко поддающихся автоматизации скоростных методов иммуноанализа без разделения компонентов (гомогенных методов); 5) создание качественных визуальных тестов для массового контроля; 6) усиление сигнала детектирования при использовании некоторых ФЗМ в методах с разделением компонентов (гетерогенных методах).

Недостатки ФЗМ

Недостатки применения ФЗМ в иммуноанализе включают: 1) ограниченную чувствительность некоторых систем без разделения компонентов; 2) канцерогенность и нестойкость некоторых ферментных субстратов; 3) помехи со стороны ряда эндогенных ФЗМ и других веществ, присутствующих в биологических жидкостях и в окружающей среде; 4) длительность некоторых анализов с применением ФЗМ; 5) сложность и невоспроизводимость, которые иногда невыгодно отличают методику определения ферментативной активности от методики измерения радиоактивности изотопа.

Чувствительность и универсальность ферментных меток

Среди ФЗМ наиболее чувствительны и универсальны, по-видимому, ферментные метки, поскольку они представляют собой белковые молекулы, обладающие чрезвычайно мощным каталитическим действием. Фермент, присутствующий в ничтожных количествах, можно выявить и количественно опреде-

лить по образованию продуктов катализируемой им реакции. Большинство используемых ферментных меток способно за 1 мин при обычных температуре и давлении превращать в продукты 10^6 молекул субстрата в расчете на одну молекулу фермента. Каталитическая эффективность фермента сильно зависит от его трехмерной структуры (конформации). Пространственная структура фермента, как и любого белка, поддерживается многочисленными нековалентными взаимодействиями, такими, как гидрофобные и водородные связи, ионные контакты, а также ковалентными дисульфидными связями. Трехмерная структура фермента обеспечивает близкое соседство определенных аминокислотных остатков в положениях, наиболее выгодных для осуществления катализа. Нековалентные химические связи непрочны и легко разрушаются или ослабляются под влиянием тепловой энергии или дополнительных нековалентных взаимодействий, возникающих, например, при связывании ионов, хаотропных агентов, детергентов, липидов и т. д. Известно, что присоединение к ферменту другой молекулы (скажем, аллостерического эффектора) в области, удаленной от активного центра (т. е. каталитического центра), может вызвать конформационную перестройку, изменяющую пространственное расположение аминокислотных остатков в этом центре. Изменения в нековалентных взаимодействиях, приводящие к новой, необычной конформации фермента, способны существенно повлиять на каталитическую активность. Подобная конформационная гибкость становится одной из помех при использовании фермента в качестве метки. Однако эта же гибкость полезна для разработки иммуноферментного анализа без разделения компонентов, основанного на вызываемых антителами изменениях в конформации конъюгата [лиганд — фермент]. Другое преимущество применения ферментов в качестве меток обусловлено наличием в их молекулах многочисленных функциональных групп (аминогрупп, сульфгидрильных, карбоксильных, карбамоильных, остатков тирозина), через которые можно ковалентно присоединять молекулы лигандов.

Иммуноферментный анализ без разделения компонентов (гомогенный анализ) и с их разделением (гетерогенный анализ)

С точки зрения способа выполнения все методы иммуноферментного анализа (ИФА) можно разбить на две группы: 1) системы, не требующие разделения компонентов (гомогенные методы), и 2) системы, для которых такое разделение необходимо (гетерогенные методы). В системах, не требующих разделения, ферментативную активность анализируемого раствора измеряют без предварительного физического разделения меченых лигандов на свободные и связанные с антителами. Такой подход возможен, когда активность меченых лигандов, связанных с антителами, существенно отличается от активности свободных меченых лигандов. Напротив, в методах с разделением получают две отдельные фракции меченого лиганда: связанную с антителами и свободную, несвязанную, и только потом измеряют активность этих фракций. Физическое разделение связанной с антителами и свободной фракций обязательно, так как анализ основан на распределении меченых конъюгатов между этими фракциями.

Иммуноферментный анализ без разделения компонентов (гомогенный анализ)

ИФА без разделения компонентов с использованием в качестве метки ферментов

Рубенштейн и др. (Rubenstein et al., 1972) описали ИФА без разделения компонентов для определения морфия. В качестве ферментной метки был использован лизоцим. Авторы предложили термин «гомогенный» иммуноферментный анализ, чтобы подчеркнуть отсутствие необходимости в физическом разделении двух форм меченного ферментом лиганда: свободной формы и связанной с антителами. Принцип анализа схематически показан на рис. 2-1. Лиганд, ковалентно связанный с ферментной меткой (Л—Ф), конкурирует с лигандом в образце (Л) за образование комплекса Ат:Л—Ф с присутствующими в ограниченной концентрации антителами (Ат) к этим лигандам (реакция *II*). Образующийся комплекс Ат:Л—Ф обладает очень низкой ферментативной активностью, так как присоединение антител вызывает либо пространственные затруднения (Rubenstein et al., 1972), либо аллостерическое ингибирование (Rowley et al., 1975). В отсутствие Л рекация *I* не протекает, а Л—Ф и Ат образуют комплекс Ат:Л—Ф, не проявляющий ферментативной активности (реакция *II*). Однако в присутствии Л происходит конкуренция за антитела, при этом какая-то часть Л—Ф остается в несвязанном состоянии и может катализировать превращение субстратов в продукты (реакция III). Таким образом, ферментативная активность прямо пропорциональна количеству свободного Л в образце.

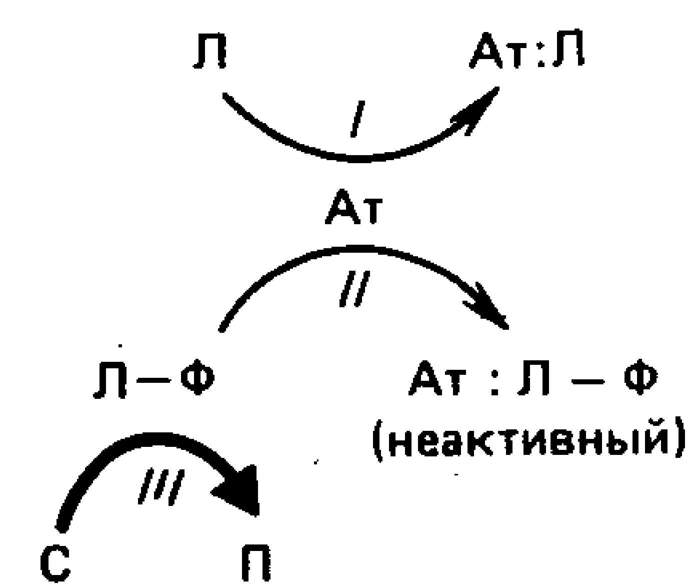


Рис. 2-1. Принцип ИФА без разделения компонентов с использованием в качестве метки лиганда, меченного ферментом.

ИФА без разделения, в котором ис-

пользуются меченные ферментом лиганды, был разработан для ряда лекарств, применяемых в терапии, и для гормонов. Среди лекарств можно назвать фенитоин, люминал, примидон, этосуксимид, карбамазепин, дигоксин, гентамицин, вальпроевую кислоту и метотрексат. Анализ проводят очень быстро, для выполнения одного определения требуется менее 1 мин. Метод к тому же очень чувствителен, с его помощью легко определить количество вещества на уровне пикомолей (Jaklitsch, 1985).

По точности и достоверности ИФА без разделения, основанный на применении конъюгатов [фермент — лиганд], сопоставим с другими иммунологическими (например, РИА) и неиммунологическими методами (например, газовой, высокоэффективной жидкостной и тонкослойной хроматографией) (Jaklitsch, 1985).

Гиббонз и др. (Gibbons et al., 1980) описали метод ИФА без разделения, предназначенный для белков, в котором используют меченные β-галактозидазой белковые антигены. При связывании антител с антигеном, содержащим ферментную метку, каталитическое действие фермента по отношению к низкомолекулярному субстрату не изменяется. В то же время ингибирование активности по отношению к высокомолекулярному субстрату достигает при образовании комплекса с антителами 95%, что обусловлено стерическим исключением субстрата из активного центра фермента. По мере увеличения концентрации антигена связывается все больше антител и сохраняется все больше свободных конъюгатов антиген — фермент, способных гидролизовать высокомолекулярный субстрат. Разработанный метод (Gibbons et al., 1980) очень чувствителен. Первоначальный вариант системы позволяет надежно определять IgG человека в концентрациях до 25 нг/мл. Недавно был предложен флуорогенный высокомолекулярный субстрат для β-галактозидазы — декстран, содержащий остатки умбеллиферил-β-галактозида. С помощью этого субстрата можно определять нанограммовые количества β-галактозидазы менее чем за 1 мин (Gibbons, 1985).

ИФА без разделения компонентов с использованием в качестве метки модуляторов ферментов

Иммуноанализ с помощью модуляторов ферментов (ИМФ) основан на способности модулятора, связанного с лигандом (М—Л), изменять активность индикаторного фермента (Ф). Конъюгат М—Л конкурирует с определяемым веществом — свободным лигандом (Л) — за добавленные в недостатке антитела (Ат) к лиганду. Находясь в комплексе с антителами, М—Л лишен возможности модулировать активность индикаторного фермента. При отсутствии лиганда (Л) реакция *I* не идет

(рис. 2-2), а М—Л соединяется по реакции *II* с Ат, утрачивая способность модулировать ферментативную активность. Однако по мере увеличения концентрации лиганд все успешнее конкурирует за места связывания на Ат (реакция *I*), поэтому все больше молекул модулятора остается в свободном состоянии и взаимодействует с индикаторным ферментом (реакция *III*), изменяя его активность (Ngo, Lenhoff, 1980a; Ngo, 1983; Ngo, 1985). В зависимости от природы модулятора ферментативная активность возрастает (положительный модулятор) или уменьшается (отрицательный модулятор). Таким образом, в случае ИМФ с положительным модулятором активность фермента прямо пропорциональна концентрации определяемого вещества. При использовании отрицательного модулятора активность обратно пропорциональна концентрации определяемого вещества.

На основе принципа ИМФ был разработан удобный метод определения тироксина в сыворотке человека. В качестве индикаторного фермента использовали ацетилхолинэстеразу, а в качестве модулятора фермента — связанный с тироксином ингибитор холинэстеразы (Finley et al., 1980). За 1 ч были исследованы 75 образцов. Результаты оказались четкими, точными и воспроизводимыми. Описана также методика определения теофиллина, построенная по тому же принципу (Blecka et al., 1983).

Для анализа тироксина разработан ИМФ на основе фрагментов рибонуклеазы, таких, как S-белок и меченный S-пептидом лиганд (Gonnelli et al., 1981; Ngo, 1985).

ИФА без разделения компонентов с использованием в качестве метки простетических групп

В этом методе простетическую группу фермента ковалентно связывают с лигандом, причем образующийся конъюгат способен воссоздавать активный голофермент из апофермента. Флавинадениндинуклеотид (FAD) представляет собой простетическую группу глюкозооксидазы (ГО). Рекомбинация FAD и апоглюкозооксидазы (АпоГО), которые сами по себе не активны, дает активную гологлюкозооксидазу (ГолоГО). Прочный конъюгат FAD — Л, получаемый в результате ковалентного присоединения метки FAD к лиганду Л, способен выполнять две функции: а) как аналог лиганда FAD — Л конкурирует с определяемым веществом (Л) за антитела к Л (реакция *II*, рис. 2-3); б) как модифицированная простетическая группа FAD — Л благодаря высокому сродству к апоглюкозооксидазе (АпоГО) может соединяться с ней (реакция *III*), формируя каталитически активную гологлюкозооксидазу (ГолоГО) (Ngo, Lenhoff, 1980b). Вместе с тем при образовании комплекса FAD — Л : Ат по реакции *II* остаток FAD теряет способность

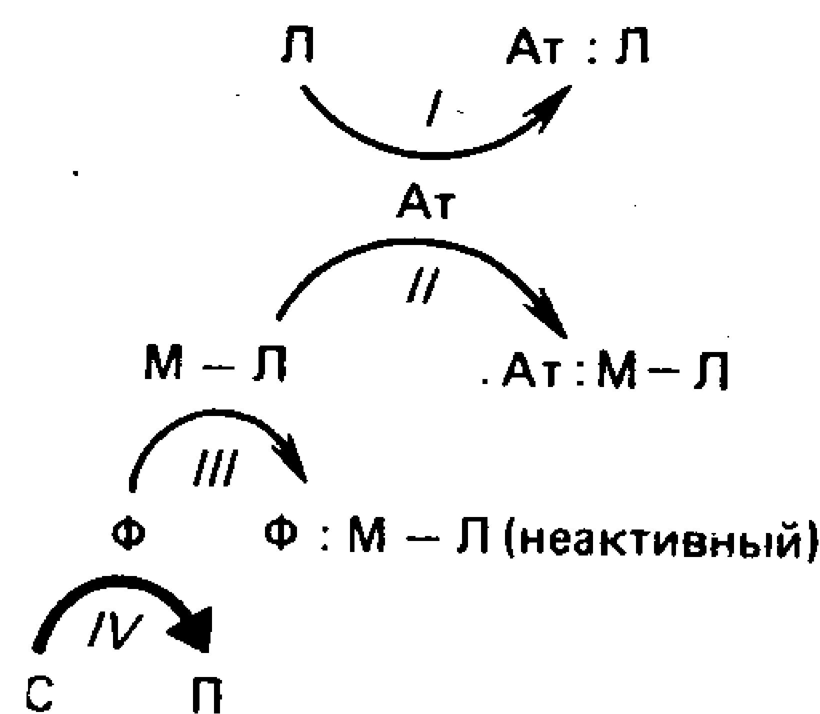


Рис. 2-2. Принцип ИФА без разделения компонентов с использованием в качестве метки модулятора фермента.

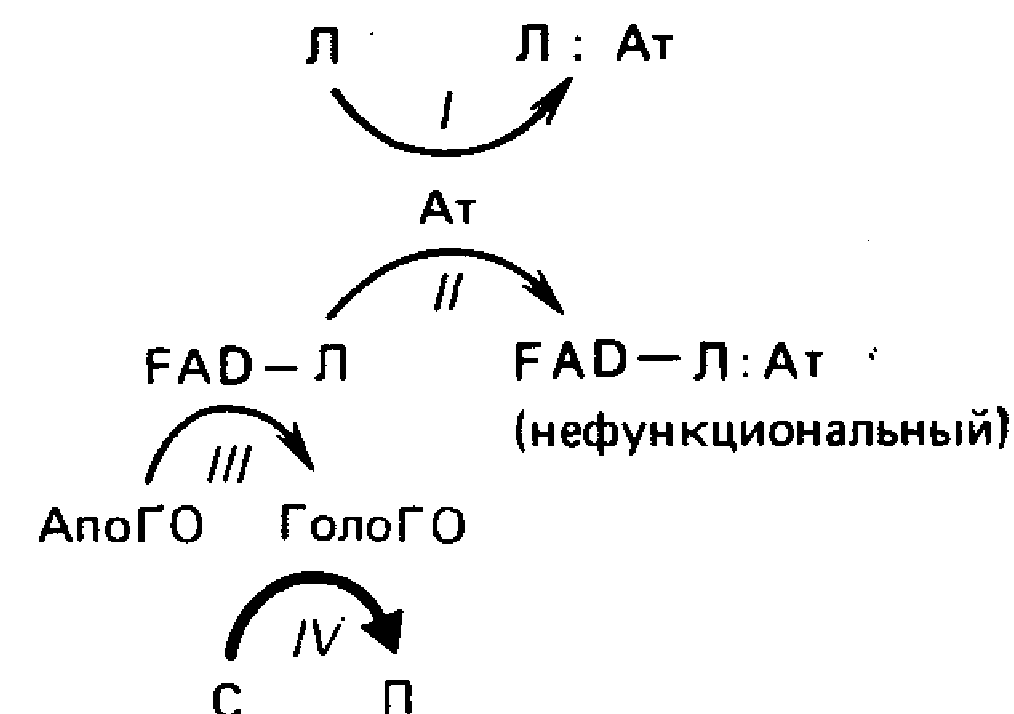


Рис. 2.3. Принцип ИФА без разделения компонентов с использованием в качестве метки простетической группы.

соединяться с апоферментом из-за возникающих пространственных затруднений. Когда в растворе нет лиганда Л, реакция *I* не идет и антитела связываются с FAD — Л (реакция *II*), лишая FAD возможности взаимодействовать с АпоГО (реакция *III*). Напротив, по мере увеличения концентрации лиганд все более успешно конкурирует за Ат (реакция *I*), причем все возрастающая часть FAD — Л сохраняется в свободном виде и может соединяться с АпоГО (реакция *III*). Это ведет к увеличению количества гологлюкозооксидазы, катализирующей реакцию *IV* (Morris et al., 1980).

Принцип, представленный на рис. 2-3, лег в основу метода определения теофиллина с пределом обнаружения 2 мкг/мл. О новом применении FAD в качестве метки для анализа макромолекул впервые сообщил Hro. Аминогексил — FAD был ковалентно соединен при помощи бис-имидатной поперечной сшивки с IgG человека, и в результате был получен прочный конъюгат FAD — IgG. Этот конъюгат способен связываться как с антителами к IgG (рис. 2-3, реакция *II*), так и с апоглюкозооксидазой (рис. 2-3, реакция *III*). В отсутствие IgG основная часть FAD — IgG соединяется с антителами и дает комплекс FAD — IgG : Ат, остаток FAD которого не может служить простетической группой для апоглюкозооксидазы; в итоге голофермент не образуется и активность отсутствует. При увеличении концентрации IgG конъюгат [FAD — IgG] высвобождается из комплекса с антителами и реагирует с апоглюкозооксидазой как простетическая группа. Следовательно, регистрируемая ферментативная активность прямо пропорциональна концентрации свободного IgG в образце.

Накане (Nakane, 1980) описал интересный вариант иммуноферментного анализа на основе изложенного принципа. Этот вариант связан с получением голопероксидазы при помощи лиганда, меченного гемом — простетической группой апопероксидазы.

ИФА без разделения компонентов с использованием в качестве метки флуорогенных субстратов

Берд и Вонг (Burd, Wong, 1977, 1979) разработали иммуноферментный анализ без разделения компонентов, основанный на использовании связанных с лигандом флуорогенных субстратов. В этом методе (рис. 2-4) производное лиганда ковалентно соединяют с флуорогенным субстратом фермента, получая прочный конъюгат [субстрат — лиганд; (С—Л)], который конкурирует с определяемым веществом за имеющиеся в ограниченной концентрации антитела к Л. В результате по реакциям *I* и *II* образуются Л : Ат и С—Л : Ат. Когда в растворе нет определяемого вещества Л, конъюгат С—Л связывается с антителами против Л; при этом индикаторная реакция *III* не идет, так как связанный с антителами конъюгат С—Л : Ат в отличие от свободного С—Л не является субстратом фермента. Однако при увеличении концентрации Л количество свободного С—Л, чувствительного к ферменту, будет возрастать и, следовательно, по реакции *III* будет образовываться большее количество продуктов. Таким образом, конъюгат [флуорогенный субстрат — лиганд; (С—Л)] играет двойную роль: а) как аналог лиганда С—Л успешно конкурирует за связывание с антителами к лиганду; б) как эффективный аналог субстрата С—Л участвует в индикаторной реакции *III* с образованием продуктов.

В этом варианте анализа фермент используют не ради усиления сигнала, а только для выявления и количественного определения свободного лиганда, меченного субстратом. Очевидно, максимальный сигнал, который можно получить, задается концентрацией свободного, несвязанного конъюгата [субстрат—лиганд]. Эта концентрация в свою очередь зависит от концентрации лиганда в анализируемом образце и должна быть сопоставима с ней. Для получения сигналов, поддающихся измерению, в качестве метки лигандов и антигенов следует использовать флуорогенные субстраты.

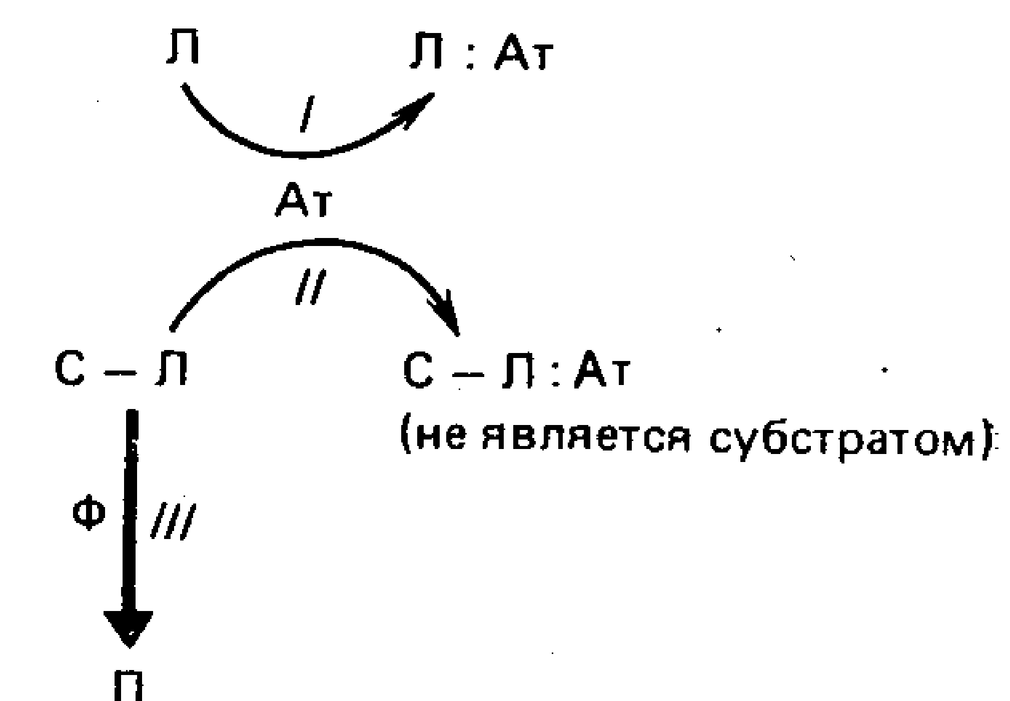


Рис. 2.4. Принцип ИФА без разделения компонентов с использованием в качестве метки флуорогенного субстрата.

Достигнутый ныне предел обнаружения (порядка микромолей) позволяет применять этот

метод в основном лишь для определения сравнительно больших концентраций лекарственных препаратов. По точности и воспроизводимости он соизмерим с газовой и жидкостной хроматографией, РИА и различными вариантами ИФА (Ngo, Wong, 1985).

Применив в качестве метки флуорогенный субстрат, Нго впервые разработал метод без разделения компонентов для определения макромолекул (Ngo, 1979, 1981). К IgG человека ковалентно присоединяют метку — производное β-галактозилумбеллиферона. IgG человека, меченный флуорогенным субстратом, служит одновременно макромолекулярным субстратом для β-галактозидазы и меченым антигеном, эффективно конкурирующим с IgG сыворотки за анти-IgG человека (рис. 2-4). Когда содержание IgG в анализируемой сыворотке невелико, антитела связываются с меченым IgG; при этом образуются трехмерные решетчатые структуры и остатки β-галактозилумбеллиферона становятся труднодоступными для фермента, из-за чего в реакции *III* образование продуктов уменьшается. Однако с повышением концентрации IgG в сыворотке крупные трехмерные решетчатые образования распадаются на более мелкие. Таким образом, остатки β-галактозилумбеллиферона оказываются более доступными для активного центра фермента и образование продуктов увеличивается.

Применение этого метода позволяет определять за 20 мин IgG человека в концентрации 0,5 мкг/мл, а получаемые результаты хорошо согласуются с данными радиальной иммунодиффузии, продолжающейся 24 ч (Ngo, 1981).

ИФА без разделения компонентов на основе конформационных ограничений метки-апофермента при взаимодействии антител с лигандом

В этом варианте анализа апофермент (АпоФ), ковалентно связанный с лигандом (Л—АпоФ), конкурирует с определяемым лигандом за добавленные в ограниченном количестве антитела. При низкой концентрации определяемого вещества преобладает реакция *II* (рис. 2-5). Следовательно, основная часть Л—АпоФ соединяется с антителами (Ат) с образованием комплекса Ат:Л—АпоФ, который не способен воссоздавать голофермент при реакции с FAD, и только оставшаяся часть Л—АпоФ связывается с FAD (реакция *III*, рис. 2-5), давая каталитически активный Л—АпоФ:FAD. Если же концентрация лиганда (Л) высока, он более успешно конкурирует за антитела (реакция *I*), при этом больше Л—АпоФ остается в свободном состоянии и взаимодействует с FAD (реакция III), образуя каталитически активный Л—АпоФ:FAD. Таким образом, концентрация выделяющегося продукта (реакция *IV*)

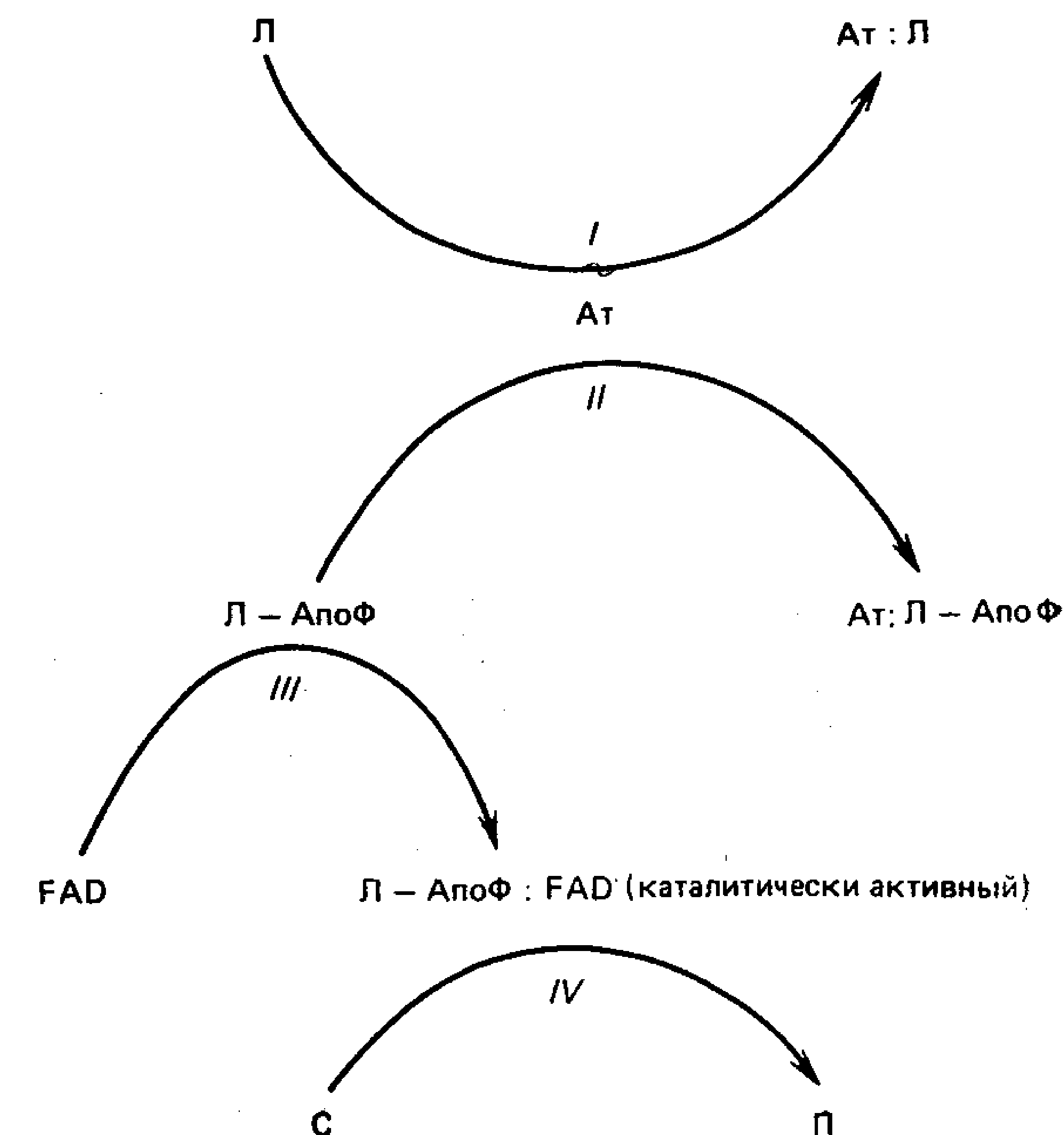


Рис. 2-5. **Принцип ИФА без разделения компонентов на основе конформационных ограничений метки-апофермента при взаимодействии с лигандом.**

прямо пропорциональна количеству определяемого лиганда в образце.

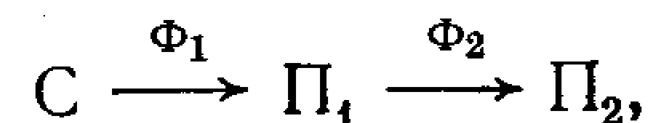
Принцип конформационных ограничений, накладываемых антителами на связанный с лигандом апофермент, был положен в основу ИФА без разделения компонентов для определения ДНФ-аминокапроата с использованием ДНФ — апоглюкозооксидазы и FAD (Ngo, Lenhoff, 1983).

В кислых денатурирующих условиях гологлюкозооксидаза, ковалентно связанная с 2,4-динитрофенильной группой (ДНФ), распадается на флавинадениндинуклеотид (FAD) и ДНФ-апоглюкозооксидазу (ДНФ—АпоГО). Оба компонента лишены каталитической активности. Примерно при pH 7 в результате связывания FAD с ДНФ—АпоГО активность восстанавливается. Этого, однако, не происходит, если перед добавлением FAD инкубировать ДНФ—АпоГО с антисывороткой против ДНФ.

Вероятно, антитела против ДНФ не допускают присоединения FAD к ДНФ—АпоГО с получением активного голофермента вследствие ограничения подвижности, мешающего полипептидной цепи ДНФ—АпоГО свернуться в каталитически активную конформацию. ДНФ-аминокапроновая кислота устраняет ингибирующее действие антител на рекомбинацию ДНФ—АпоГО и FAD с образованием активного фермента.

ИФА без разделения компонентов с использованием «ферментных каналов»

Если два фермента $Ф_1$ и $Ф_2$, катализирующих две последовательные реакции превращения субстрата (С) в $П_1$ и далее в $П_2$ по схеме:



$$С \xrightarrow{Ф_1} П_1 \xrightarrow{Ф_2} П_2,$$

привести в тесный контакт, например путем совместной иммобилизации на твердом носителе, то начальная скорость образования $П_2$ будет выше, чем при раздельном действии ферментов $Ф_1$ и $Ф_2$ в растворе (Mosbach, Mattiasson, 1970).

В одном из вариантов анализа определяемый антиген, иммобилизованный совместно с $Ф_2$ на мелких гранулах (Л—⊙—$Ф_2$), может конкурировать с Л (реакции *I* и *II*, рис. 2-6) за постоянное и ограниченное число антител, ковалентно связанных с $Ф_1$ ($Ф_1$—Ат). Суммарный рост скорости образования $П_2$ определяется степенью включения ферментов в комплекс $Ф_1$—Ат : Л—⊙—$Ф_2$, обеспечивающий более высокую общую скорость, чем последовательно действующие ферменты вне комплекса (т. е. $Ф_1$—Ат и Л—⊙—$Ф_2$).

Таким образом, в отсутствие Л реакция *I* не протекает, а бóльшая часть Л—⊙—$Ф_2$ участвует в реакции *II* с образованием $Ф_1$—Ат : Л—⊙—$Ф_2$ и скорость превращения С в $П_2$ увеличивается. Наоборот, при высокой концентрации Л реакция *I* преобладает и в результате по реакции II образуется меньше $Ф_1$—Ат : Л—⊙—$Ф_2$. Итак, увеличение концентрации Л (определяемого вещества) подавляет суммарное ускорение реакции *III*. Чтобы свести к минимуму влияние побочных реакций под действием свободных, несвязанных $Ф_1$—Ат, Л—⊙—$Ф_2$ и $Ф_1$—Ат : Л (которые все же в состоянии катализировать превращение С в $П_1$ и $П_2$), нужно удалять $П_1$ из раствора. Для этого добавляют «вычищающий» фермент $Ф_3$, который превращает $П_1$ в $П_3$. Продукт $П_1$, образующийся на твердой фазе, гораздо труднее превращается в $П_3$, так как комплекс $Ф_1$—Ат : Л—⊙$Ф_2$ стерически исключает молекулу $Ф_3$. Диффузия $П_1$ в окружающий раствор замедляется, вероятно, из-за наличия неперемешиваемого слоя вокруг гранул.

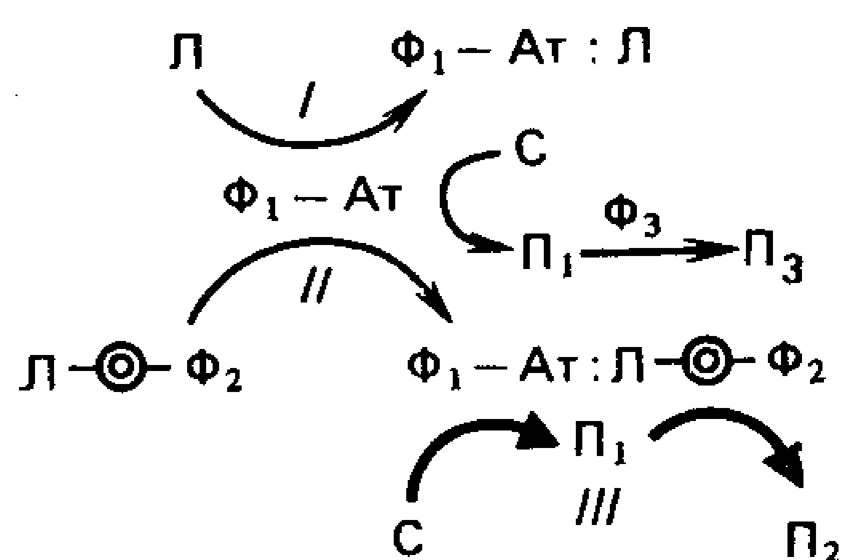


Рис. 2-6. Принцип ИФА без разделения компонентов с использованием «ферментных каналов».

Литман и др. (Litman et al., 1980) показали, что использование «ферментного канала» в системе для иммуноанализа без разделения

компонентов позволяет количественно определять за 2 ч IgG человека в концентрации порядка 1 нг/мл. Последовательные ферментативные реакции осуществляли с помощью гексокиназы и глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы. «Вычищающими» ферментами служили фосфоглюкозоизомераза и фосфофруктокиназа.

ИФА без разделения компонентов с использованием ферментов, включенных в липосомы

Методы ИФА с помощью ферментов, включенных в липосомы, можно подразделить на две группы: 1) не зависящие от комплемента и 2) зависящие от комплемента. Первые не связаны с компонентами системы комплемента, лизирующей липосомные мембраны, тогда как для вторых функционально активная система комплемента необходима.

Методы, не зависящие от комплемента. В этом варианте анализа лиганд метят цитолизином, способным разрушать клеточную или липосомную мембрану. Конъюгат [лиганд — цитолизин; (Л—Ц)] служит агентом, проникающим через мембра-

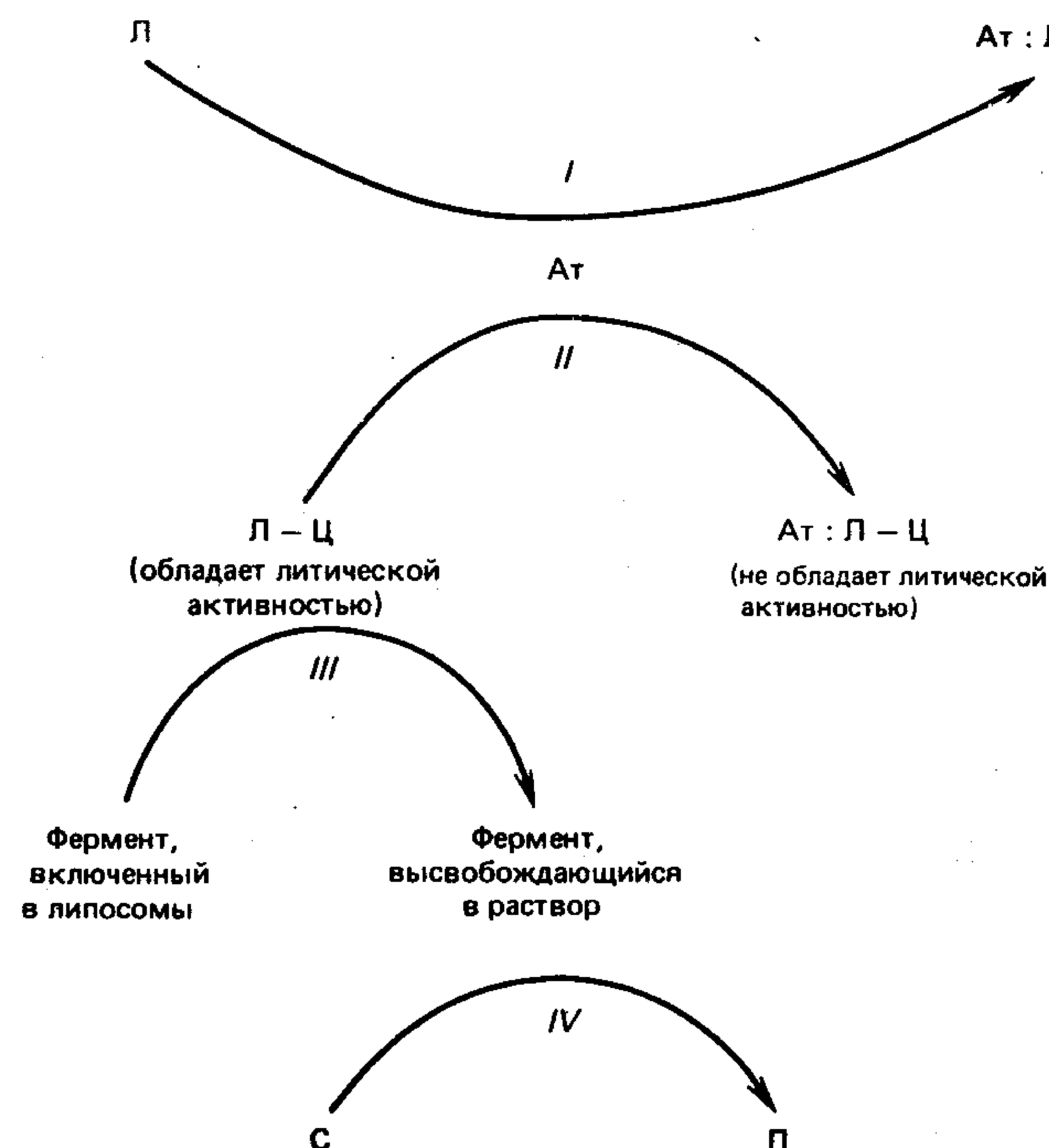


Рис. 2-7. Принцип ИФА без разделения компонентов с использованием конъюгата [лиганд — цитолизин] и фермента, включенного в липосомы (система, не зависящая от комплемента).

ну, и, кроме того, аналогом лиганда, конкурирующим с лигандом анализируемого образца. Однако при связывании Л—Ц со специфическими антителами против лиганда литическая активность утрачивается. Принцип метода схематически показан на рис. 2-7. Ковалентный конъюгат [лиганд — цитолизин; (Л—Ц)] конкурирует с лигандом (Л) за образование комплекса Ат:Л—Ц с антителами (Ат) к лиганду (реакция *II*). Этот комплекс если и проявляет литическую активность, то очень слабую, так как присоединение антител создает, по-видимому, пространственные затруднения, мешающие контакту цитолизина с мембраной. Следовательно, в отсутствие Л реакция *I* не протекает, а Л—Ц и Ат дают комплекс Ат:Л—Ц по реакции *II*, сопровождающейся потерей литической активности. Наоборот, при высоких концентрациях Л реакция *I* преобладает, поэтому остается меньше антител, связывающих Л—Ц в комплекс, и сохраняется больше свободных Л—Ц, лизирующих липосомы (реакция *III*). В результате липосомы освобождают больше молекул фермента и выход продуктов увеличивается (реакция *IV*). Таким образом, ферментативная активность прямо пропорциональна количеству свободного Л в исследуемом образце.

Литчфилд и др. (Litchfield et al., 1981) разработали чувствительный и быстрый метод определения дигоксина с использованием заключенной в липосомы щелочной фосфатазы и конъюгата уабаин — мелиттин. Уабаин представляет собой аналог дигоксина, а мелиттин — 26-членный литический пептид из пчелиного яда.

Методы, зависящие от комплемента. В этих методах лиганд ковалентно связывают с полярным липидом, таким, как фосфатидилэтаноламин. Затем этот конъюгат вводят в состав мембран при получении липосом, содержащих молекулы фермента. Когда специфические антитела против лиганда образуют комплекс с лигандом, находящимся на липосоме, последняя становится чувствительной к лизису под действием системы комплемента. В случае высокомолекулярных антигенов, например белков, сначала получают липосомы с заключенным в них ферментом, а потом к липосомным мембранам непосредственно или с помощью бифункциональных сшивающих агентов ковалентно присоединяют антигены. Принцип анализа схематически показан на рис. 2-8. Лиганд, ковалентно связанный с липосомными мембранами (Л—Лип), конкурирует с определяемым лигандом (Л) за образование комплекса Ат:Л—Лип с антителами (Ат) против лиганда (реакция *II*). В присутствии комплемента комплекс Ат:Л—Лип лизируется (реакции *III* и *IV*), освобождая захваченный фермент. Если в растворе нет Л, то реакция *I* не идет, а Л—Лип и Ат соединяются в комплекс Ат:Л—Лип по реакции *II*. Далее этот комплекс разрушается комплементом с выделением захваченного фермента, катализирующего превра-

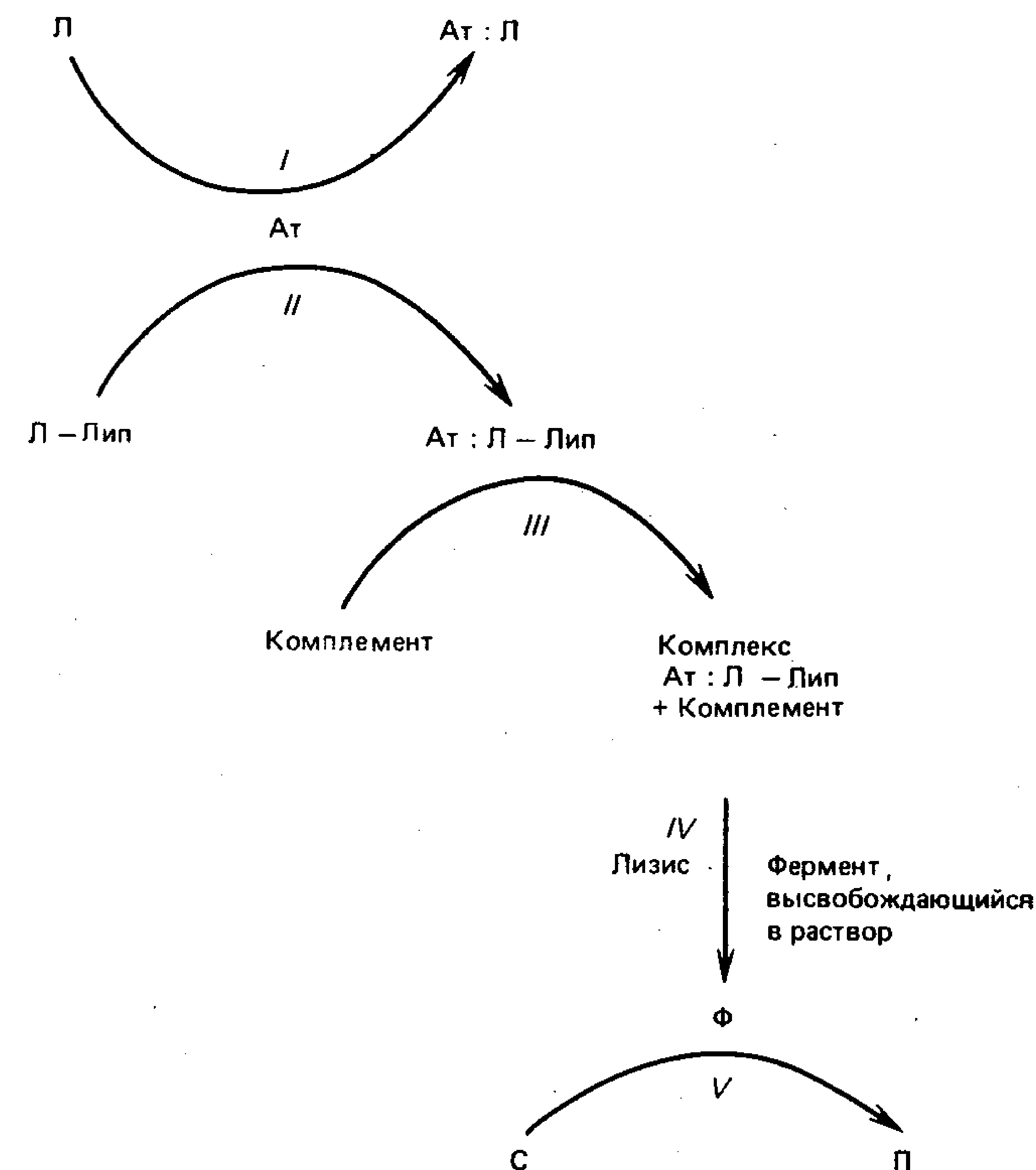


Рис. 2-8. Принцип ИФА без разделения компонентов с использованием лиганда, связанного с липосомами, и фермента, включенного в липосомы (система, зависящая от комплемента).

щение субстрата в продукт (реакция *V*). Однако при наличии Л происходит конкуренция за антитела, и поэтому количество Л—Лип, остающееся вне комплексов и не подвергающееся лизису под действием комплемента, увеличивается. Таким образом, измеряемая ферментативная активность обратно пропорциональна концентрации анализируемого лиганда в образце.

ИФА без разделения компонентов с использованием индикаторных полосок

ИФА без разделения компонентов можно сделать гораздо более удобным и, вероятно, более надежным, если все необходимые для анализа реагенты поместить на одной и той же твердой полимерной матрице (например, в виде индикаторной полоски). В этом случае экспериментатору нужно только погрузить полоску в исследуемый раствор на заданное время и затем оценить результат реакции визуально или с помощью прибора.

Глэд и Грабб (Glad, Grubb, 1978) разработали метод иммунокапиллярной миграции для количественного определения антигенов. Метод основан на капиллярной миграции антигена в пористом носителе, содержащем иммобилизованные антитела. Взаимодействие с иммобилизованными антителами тормозит миграцию. По мере повышения концентрации антигена с ним связывается все возрастающая доля иммобилизованных антител. Поэтому часть молекул антигена продвигается все дальше, пока их миграция не остановится из-за комплексообразования с иммобилизованными антителами. Таким образом, расстояние миграции прямо пропорционально содержанию антигена в образце. Для проявления области, в которой после миграции находится антиген, полоску обрабатывают антителами к нему, содержащими флуоресцентную или ферментную метку. Такие антигены, как С-реактивный белок, можно количественно определять при концентрации ~0,15 мкг/мл за 15 мин.

На основе сочетания иммунокапиллярной миграции (Glad, Grubb, 1978) и принципа «ферментных каналов» (Litman et al., 1980) был создан метод ферментативной хроматографии для количественного анализа веществ (Litman, 1985). В этом методе используют: 1) антитела, иммобилизованные на полоске бумаги; 2) раствор ферментов, содержащий глюкозооксидазу и меченный пероксидазой лиганд; 3) раствор субстратов, содержащий глюкозу и хлорнафтол. При выполнении анализа исследуемый раствор добавляют к раствору ферментов, погружают в полученную смесь конец бумажной полоски с иммобилизованными антителами и дают возможность растворителю подниматься по ней вверх. Спустя 10 мин бумажную полоску вынимают и целиком опускают в раствор субстратов. Через 5 мин появляется окрашенная зона, высота которой прямо пропорциональна концентрации лиганда в образце.

Реагенты для иммуноферментного анализа с применением в качестве метки флуорогенных субстратов и простетических групп также удалось нанести на полоски и использовать для анализа по принципу погружения в раствор и считывания результата (Greenquist et al., 1981; Tyhach et al., 1981).

Иммуноферментный анализ с разделением компонентов (гетерогенный анализ)

ИФА с разделением компонентов одновременно предложили Ван-Вееман и Шуурс (Van Weeman, Schuurs, 1971) и Энгвалл и Пэлманн (Engvall, Perlmann, 1971). В основе большинства методов ИФА с разделением лежат принципы, разработанные в иммуноанализе с использованием радиоактивных меток.

Конкурентный ИФА с разделением компонентов

В этом методе меченный ферментом лиганд (Л—Ф) конкурирует с лигандом (Л) анализируемого образца за ограниченное число антител, иммобилизованных на твердом носителе (ИАт). После непродолжительной инкубации отделяют Л—Ф, связавшийся с антителами, от свободного Л—Ф (рис. 2-9) и анализируют фракцию, связанную с антителами. Ферментативная активность твердой фазы обратно пропорциональна концентрации определяемого лиганда.

Специфичность метода, как и в случае РИА, зависит от специфичности применяемых антител. При использовании конкурентного метода можно достоверно определять пикограммовые количества гормонов и других веществ (Bosh et al., 1978).

Ингибиторный ИФА с разделением компонентов

В этом методе (рис. 2-10) иммобилизованный лиганд (ИЛ) конкурирует с лигандом анализируемого образца за присутствующие в постоянной концентрации растворимые антитела, меченные ферментом (Ат—Ф) (реакции *I* и *II*). Ферментативная активность комплексов ИЛ:Ат—Ф обратно пропорциональна концентрации определяемого вещества (Л) (реакция *III*). В отсутствие Л конъюгат Ат—Ф полностью связывается с ИЛ, поэтому ферментативная активность иммобилизованной фракции максимальна.

К преимуществам ингибиторного ИФА с использованием меченых антител относятся: 1) быстрота анализа, состоящего только из двух стадий инкубации и одной стадии отмывки; 2) возможность получения прочных конъюгатов [фермент — антитело] по стандартным методикам; 3) высокая чувствительность, достоверность и воспроизводимость. IgG человека можно количественно определять на уровне пикомолей менее чем за 1,5 ч (Halliday, Wisdom, 1978).

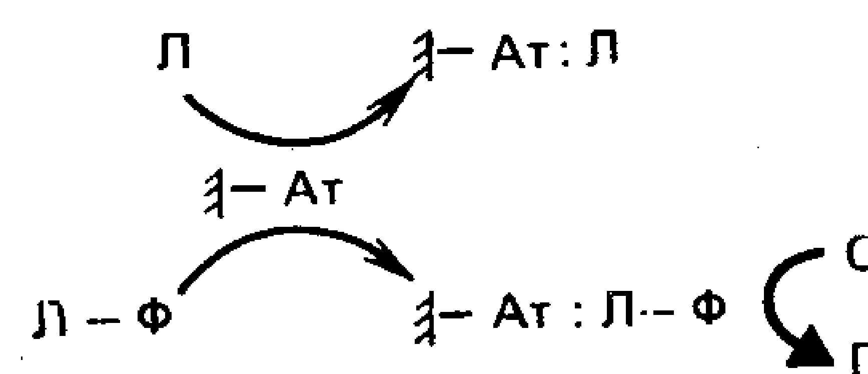


Рис. 2-9. Принцип ИФА с разделением компонентов, основанного на использовании иммобилизованных на твердом носителе антител и меченного ферментом лиганда (Л—Ф).

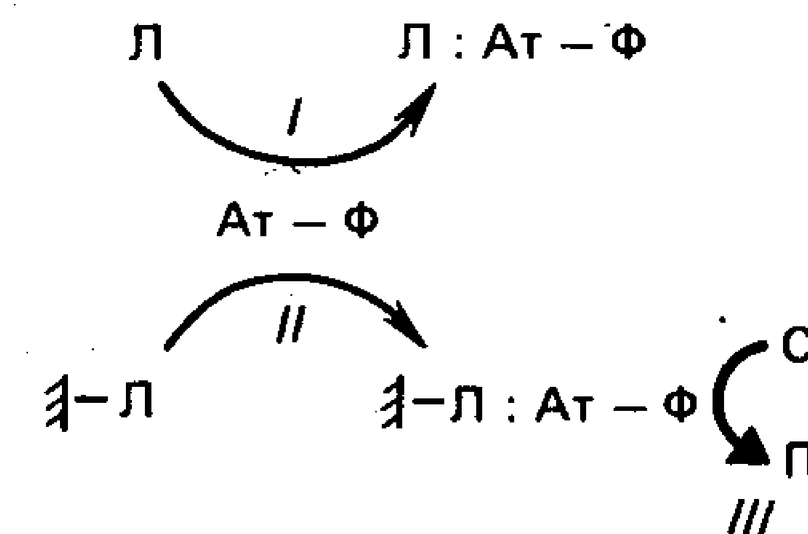


Рис. 2-10. Принцип ингибиторного ИФА с разделением компонентов.

Сэндвич-ИФА с разделением компонентов

Этот метод применяют для антигенов с несколькими эпитопами (рис. 2-11). Избыток иммобилизованных антител смешивают с анализируемым раствором, а после инкубации и промывания добавляют антитела, меченные ферментом. Ферментативная активность иммобилизованного комплекса прямо пропорциональна содержанию антигена в исследуемом образце. В ИФА по методу «сэндвич» не происходит конкуренции между меченым и немеченым антигенами. По сравнению с конкурентными методами сэндвич-ИФА потенциально чувствительнее и обладает тем преимуществом, что не требует очищенных антигенов.

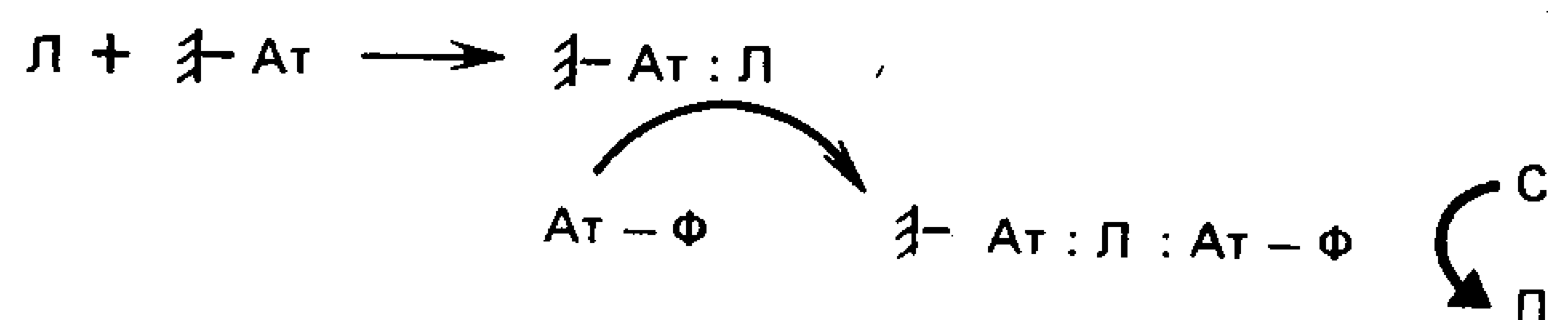


Рис. 2-11. Принцип сэндвич-ИФА, основанного на использовании иммобилизованных антител и антител, меченных ферментом (Ат—Ф).

В отличие от конкурентного ИФА, включающего лишь две стадии инкубации и одну стадию отмывки, в сэндвич-ИФА с применением поликлональных антител проводят три стадии инкубации и две стадии отмывки. Однако при использовании моноклональных антител, специфичных к разным участкам антигена, число стадий инкубации и промывания в сэндвич-методе можно сократить соответственно до двух и одной.

Сэндвич-ИФА пригоден для количественного определения веществ, содержащих много антигенных детерминант, например для антител, ревматоидных факторов, полипептидных гормонов, белков и поверхностных антигенов гепатита В. С точки зрения точности, чувствительности и удобства сэндвич-ИФА сопоставим с радиоиммунологическим анализом. При помощи сэндвич-метода были количественно определены макромолекулярные антигены на уровне аттомолей (Ishikawa et al., 1980).

ИФА с разделением компонентов, основанный на ферментативной иммунометрии (ИФАИМ)

Этот метод можно применять для определения лигандов, обладающих как одной, так и несколькими антигенными детерминантами (рис. 2-12). К образцу прибавляют избыток меченных ферментом антител против лиганда (Ат—Ф), а затем избыток иммобилизованного лиганда (ИЛ). Связавшиеся с иммо-

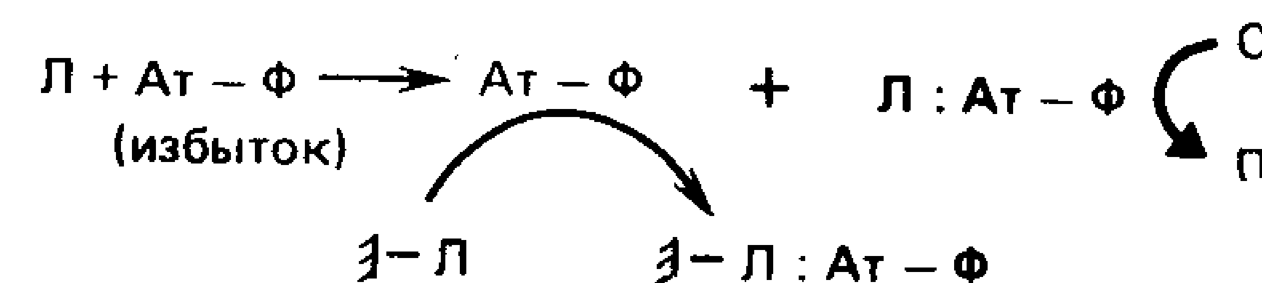


Рис. 2-12. Принцип ИФА с разделением компонентов, основанного на ферментативной иммунометрии (ИФАИМ).

билизованным лигандом антитела, меченные ферментом, отделяют от растворимых комплексов [лиганд — меченое антитело] путем непродолжительного центрифугирования. Ферментативная активность растворимой фракции возрастает пропорционально содержанию лиганда в образце. Благодаря использованию в ИФАИМ избытка реагентов этот метод чувствительнее, чем конкурентный ИФА, а его аналитические возможности приближаются к предельным.

Новый подход к количественному определению гормонов и лекарственных веществ методом ИФАИМ описали Гнемми и др. (Gnemmi et al., 1978). Они использовали антитела, специфичные к антигенам (называемые первыми антителами), и меченные ферментом антитела против анти-IgG (называемые вторыми антителами и вступающие в иммунологическую реакцию с первыми антителами). При взаимодействии меченных ферментом вторых антител с первыми антителами образуется ферментный иммунокомплекс. Согласно стандартной методике, образец инкубируют с заранее полученным ферментным иммунокомплексом, избыток которого впоследствии удаляют из раствора добавлением антигена, иммобилизованного на твердом носителе. Ферментативная активность твердой фазы обратно пропорциональна концентрации антигена в образце.

Метод ИФАИМ (рис. 2-12) отличается от ингибиторного ИФА (рис. 2-10) применением избытка антител, а также отсутствием конкуренции между определяемым и иммобилизованным лигандом за места связывания на антителах.

Непрямой ИФА с разделением компонентов

Непрямой ИФА чаще всего применяют для количественного определения в сыворотке специфических антител, вырабатываемых против патогенов. В этом методе (рис. 2-13) лиганд или антиген, иммобилизованный на твердом носителе, инкубируют с анализируемым образцом, затем твердую фазу промывают и инкубируют с антивидовыми антителами к иммуноглобулинам, содержащими ферментную метку ($Ат_2$—Ф). После отделения твердой фазы измеряют активность связанного с ней фермента, которая прямо пропорциональна концентрации антител (Ат) в исследуемом образце.

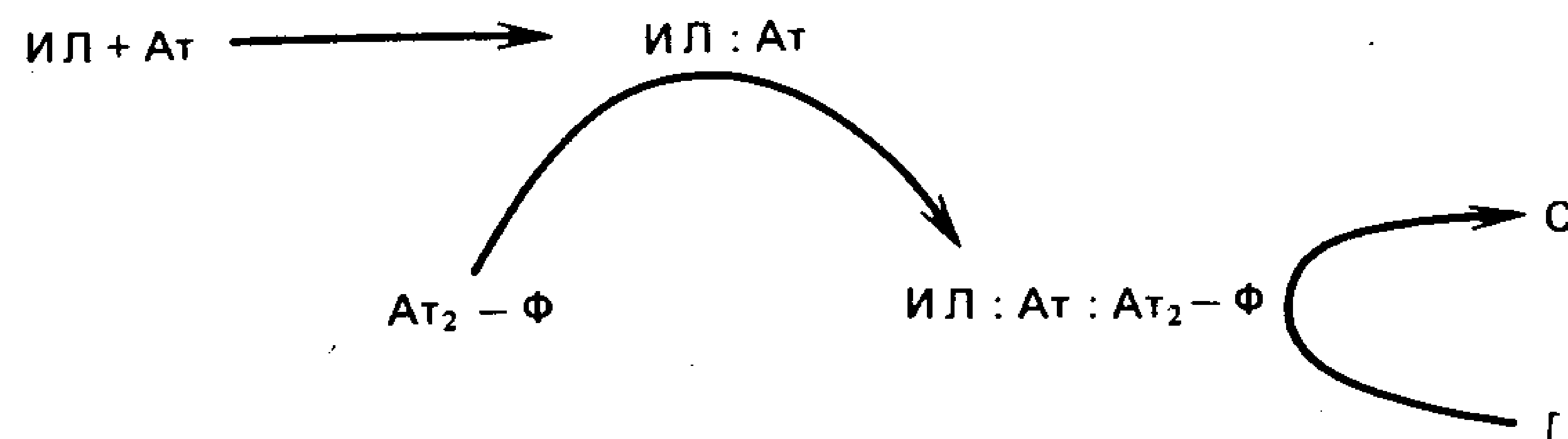


Рис. 2-13. Принцип непрямого ИФА с разделением компонентов. ИЛ — иммобилизованный лиганд или антиген; $Ат_2$—Ф — меченный ферментом анти-IgG.

Непрямой ИФА был использован для обнаружения и количественного определения антител против бактериальных и вирусных антигенов, таких, как плазмодий, трипаносома, *E. coli*, холерный вибрион, тифозные риккетсии, вирус свиной чумы, вирус простого герпеса, вирус краснухи (Halbert, Lin, 1985).

ИФА с разделением компонентов, основанный на использовании конъюгатов [фермент — лиганд], маркированных якорной группой

Этот метод основан на блокировании антителами дополнительного маркера (якоря; Я) в конъюгате [фермент—лиганд—якорь]. Принцип метода, схематически представленный на рис. 2-14, можно вкратце описать следующим образом:

1. Конкуренция в растворе за антитела (Ат) между несвязанным лигандом (Л) и лигандом в составе маркированного якорной молекулой конъюгата (Л—Ф—Я) согласно реакциям *I* и *II* на рис. 2-14.

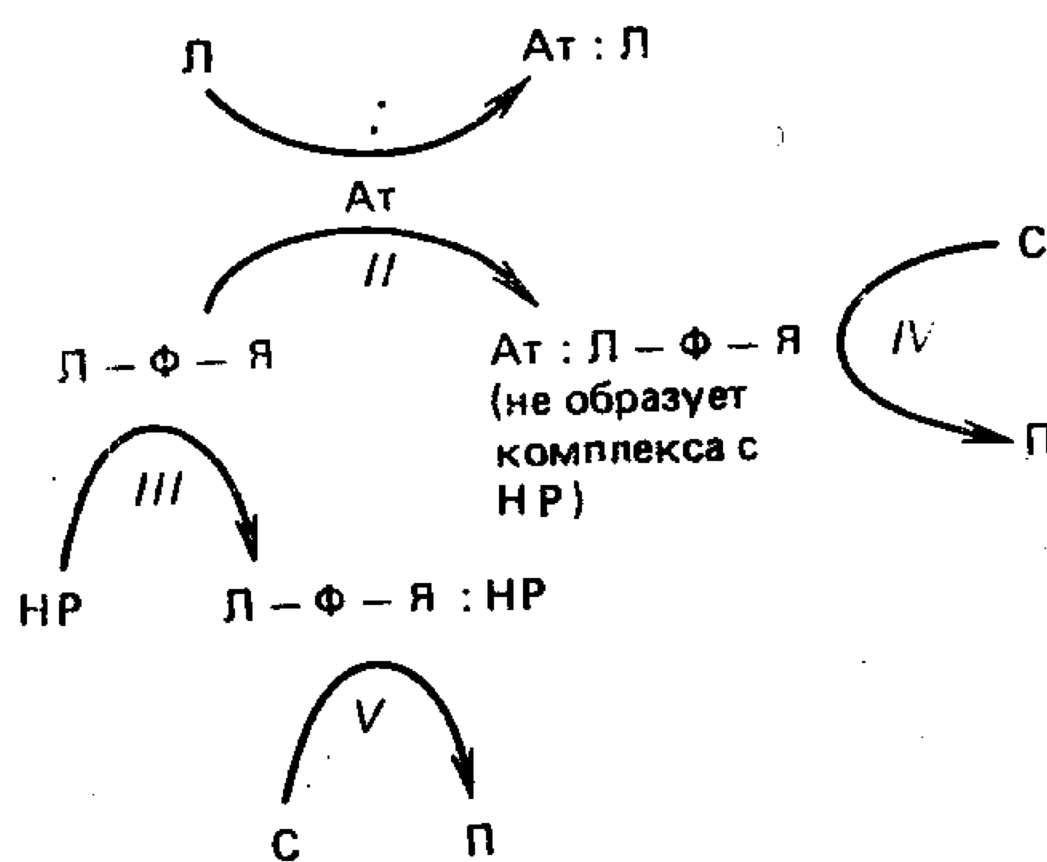


Рис. 2-14. Принцип ИФА с разделением компонентов, основанного на использовании маркированных конъюгатов [лиганд — фермент].

2. Отделение маркированного конъюгата [фермент—лиганд—якорь], связавшегося с антителами (Ат : Л—Ф—Я), от свободного Л—Ф—Я путем присоединения Л—Ф—Я к иммобилизованному рецептору (ИР) с образованием Л—Ф—Я : ИР (реакция *III*) и последующего непродолжительного центрифугирования. Связывание Л—Ф—Я и ИР происходит на гетерогенной поверхности, разделяющей твердую и жидкую фазы. Маркер Я, содержащийся в комплексе Ат : Л—Ф—Я, не способен соединяться с ИР — этому мешают Ат.

3. Измерение ферментативной активности комплекса Ат : Л—Ф—Я в надосадочной жидкости (реакция *IV*) или комплекса Л—Ф—Я : ИР в нерастворимой фракции (реакция *V*).

В этом методе используют постоянные концентрации Л—Ф—Я, Ат и ИР. Количество свободного Л—Ф—Я, доступного для ИР, зависит от содержания Л, так как Л и Л—Ф—Я конкурируют за антитела (реакции *I* и *II*). Чем ниже концентрация Л, тем больше Ат вступает в реакцию *II* с Л—Ф—Я и тем меньше остается свободного Л—Ф—Я, способного присоединяться к ИР. Образуя с Ат комплекс Ат : Л—Ф—Я по реакции *II*, Л—Ф—Я теряет возможность связываться с ИР. По-видимому, это обусловлено тем, что Ат в комплексе Ат : Л—Ф—Я физически препятствует взаимодействию между маркёром Я и ИР.

Таким образом, как следует из рис. 2-14, при низкой концентрации Л активность супернатанта велика (реакция *IV*), а активность нерастворимой фракции мала (реакция *V*). В то же время большее количество Л связывает больше Ат (реакция *I*), освобождая Л—Ф—Я, который соединяется с ИР (реакция *III*). В итоге активность нерастворимой фракции становится выше, а активность супернатанта ниже.

Использование этого метода позволяет определять вещества на уровне наномолей за 1 ч (Ngo, Lenhoff, 1981b).

ИФА с разделением компонентов, основанный на пространственных затруднениях

Кастро и Монджи разработали метод ИФА, основанный на новом принципе разделения компонентов (Castro, Monji, 1985). В этом методе используют меченные ферментом лиганды и аффинный гель, который обладает сродством к ферменту в составе свободного, т. е. не связанного с антителами конъюгата [фермент — лиганд] и не обладает сродством к конъюгату, связанному с антителами. Вероятно, это объясняется пространственными затруднениями, возникающими в результате присоединения антител к меченному ферментом лиганду и не допускающими эффективного взаимодействия между аффинным гелем и активным центром фермента. По этой причине метод называют иммуноферментным анализом, основанным на пространственных затруднениях (ИФАПЗ).

Принцип ИФАПЗ схематически показан на рис. 2-15. Лиганд, ковалентно связанный с ферментной меткой (Л—Ф), конкурирует с лигандом Л образца за ограниченное число антител (Ат). Без Л реакция *I* не протекает, а Л—Ф и Ат образуют комплекс Ат : Л—Ф по реакции *II*. Этот комплекс не связывается аффинным гелем (АГ) и поэтому остается в надосадочной жидкости, полностью сохраняя ферментативную активность (реакция *IV*).

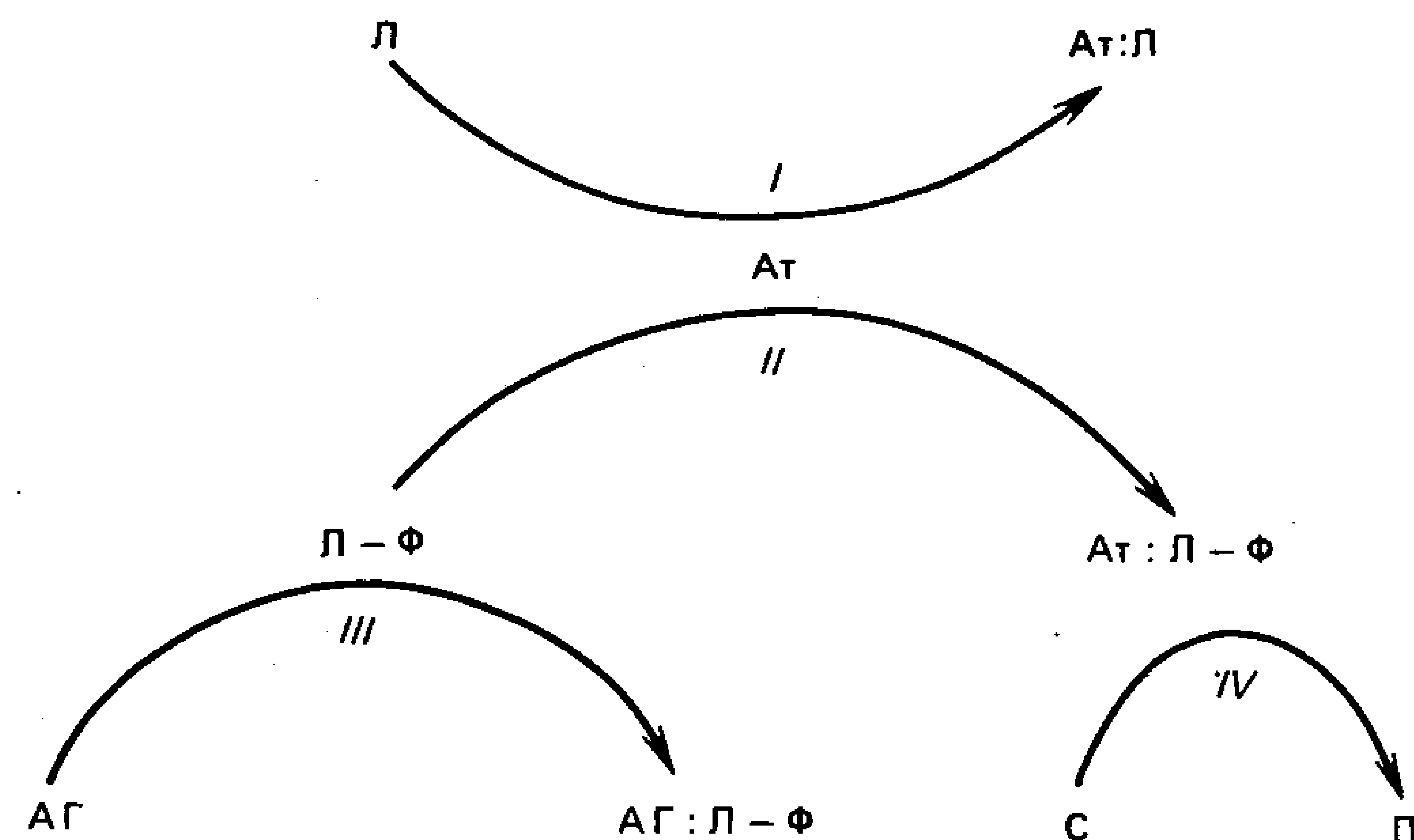


Рис. 2-15. Принцип ИФА на основе пространственных затруднений.

Однако в присутствии Л происходит конкуренция за антитела, так что определенная доля Л—Ф остается вне комплексов и может соединяться с аффинным гелем (АГ), покидая фазу супернатанта (реакция *III*).

Разработан чувствительный метод определения хориомаммотропина и тироксина с использованием в качестве ферментной метки β-галактозидазы и в качестве аффинного геля 6-аминокапроил-β-D-галактозиламин-агарозы (Castro, Monji, 1985).

ИФА с разделением компонентов для определения изоферментов

Изоферменты — это родственные, но различающиеся по структуре белки, катализирующие сходные реакции. Состав и количество многих изоферментов, например изоформ лактатдегидрогеназы и креатинкиназы, изменяется при патологическом состоянии организма. Так, у человека после инфаркта миокарда в крови в несколько раз возрастает содержание лактатдегидрогеназы и креатинкиназы, выделяемых сердечной мышцей. Как правило, изоферменты обладают субъединичным строением и состоят из мономерных субъединиц двух или нескольких типов. Изоферменты из разных органов имеют неодинаковый субъединичный состав, что отражается на их электрофоретической подвижности. При использовании антител, специфически ингибирующих ферментативную активность субъединиц определенного типа, для избирательного связывания и удаления изоферментов сложного строения, содержащих такие субъединицы, можно точно измерить ферментативную активность и количество оставшегося в растворе изофермента, важного для диагностики заболевания (Wicks, Usategui-Gomez, 1985).

Принцип простейшего варианта ИФА с разделением компонентов для определения изоферментов схематически показан на рис. 2-16. На представленной схеме НН, НМ и ММ обозначают три гипотетических изофермента из разных органов, причем изофермент НН имеет отношение, например, к заболеванию сердца, и его содержание в сыворотке сильно возрастает сразу же после начала болезни.

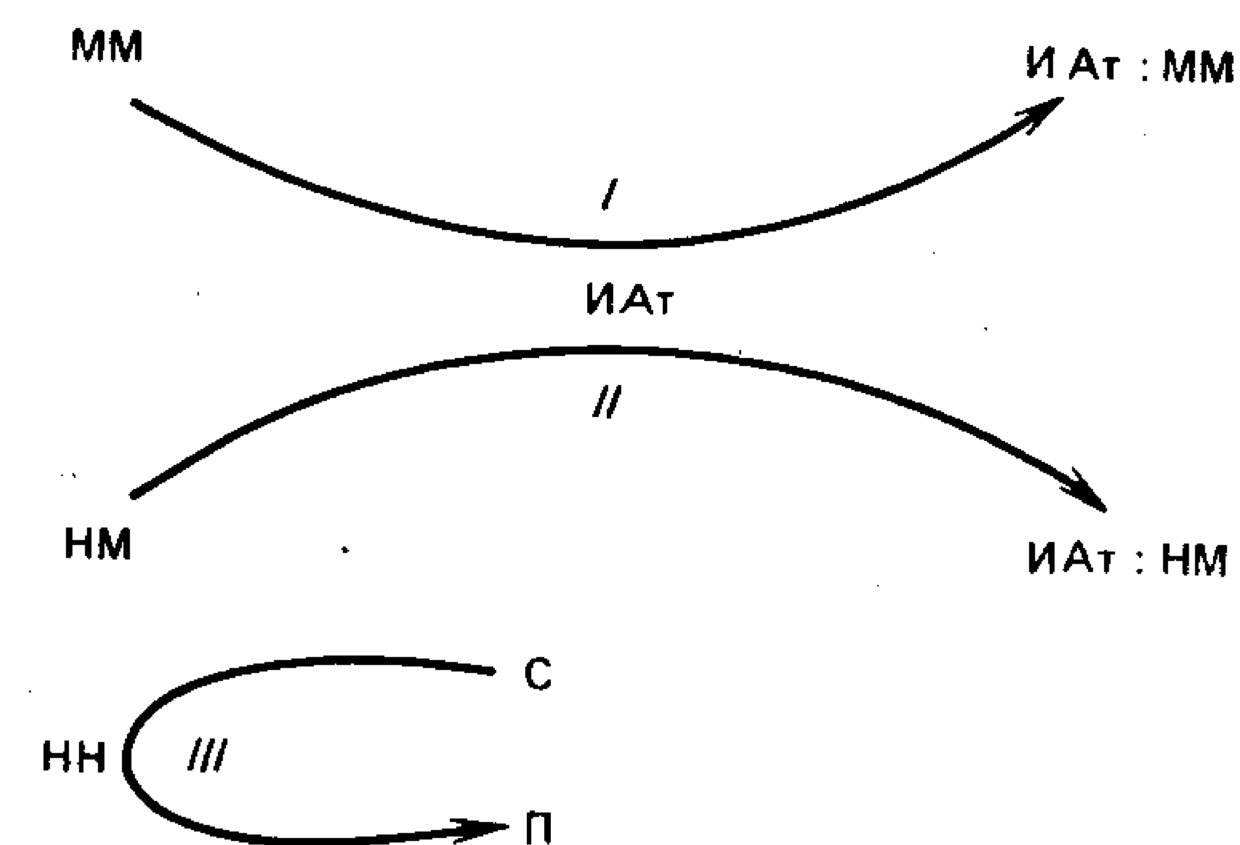


Рис. 2-16. Принцип ИФА с разделением компонентов для определения изоферментов.

Для определения количества НН сыворотку инкубируют с иммобилизованными на твердой матрице антителами (ИАт), которые специфически подавляют активность субъединицы М и соединяются с изоферментами, содержащими эту субъединицу (реакции *I* и *II*). После инкубации и центрифугирования, позволяющего удалить из раствора все связанные с антителами изоферменты, определяют активность изофермента НН и находят таким образом его количество в сыворотке (реакция *III*).

Разработаны удобные методики для определения изоферментов, связанных с сердечной деятельностью, таких, как лактатдегидрогеназа-1 (Н4) и креатинкиназа МВ. Эти методики обеспечивают надежные результаты, хорошо согласующиеся с результатами электрофореза (Wicks, Usategui-Gomez, 1985).

Описанный метод пригоден только для изоферментов с легко измеряемой активностью. При его использовании следует осторожно обращаться с сывороткой пациента, чтобы не допустить денатурации изоферментов. От сохранения их активности в решающей степени зависит успех анализа.

Усиление ферментативных сигналов

Чувствительность иммуноанализа зависит от констант связывания специфических антител. Чем больше константа связывания, тем чувствительнее система (Yalow, 1980). Помимо антител с высокой константой связывания для создания удобного метода анализа необходима чувствительная метка, облегчающая детектирование. Фермент-зависимые метки, как правило, очень чувствительны, так как они усиливают слабые сигналы благодаря катализу. Удалось, например, определить даже отдельную молекулу фермента β-галактозидазы (Rotman, 1961).

Предложено несколько способов дальнейшего повышения чувствительности ферментных меток. Например, в методе ELISA с усилением используют комплексы ферментов со специфическими антителами (Butler et al., 1985); в системе «ABC» применяют комплексы авидина с конъюгатом [биотин — фермент] и конъюгаты биотина с антителами (Hsu, 1985).

Заключение

Фермент-зависимые метки (ФЗМ) — универсальные и чувствительные метки для иммуноанализа. Они отличаются продолжительным периодом полуинактивации, не создают радиационной опасности и позволяют проводить иммуноферментный анализ (ИФА) без разделения компонентов (гомогенный анализ). ИФА без разделения требует меньше манипуляций и легче поддается автоматизации. Однако на нынешнем этапе своего развития этот метод недостаточно чувствителен. В то же время ИФА с разделением компонентов (гетерогенный анализ) обладает высокой чувствительностью и дает возможность определять два различных вещества одновременно. Превосходным примером высокой чувствительности ИФА с разделением компонентов служит метод определения ферритина, позволяющий измерять 0,2 аттомоль, т. е. $2 \cdot 10^{-19}$ моль вещества (Ishikawa et al., 1982).

Вероятно, дальнейшее развитие ИФА приведет к созданию: 1) более чувствительных ФЗМ; 2) управляемых методов связывания лигандов с ферментами; 3) автоматических приборов; 4) твердофазных реагентов для проведения анализа по принципу погружения в раствор и считывания результата.

Литература

Adler F., Liu C. T. (1971). Detection of morphine by hemaglutinatin—inhibition, J. Immunol., **106**, 1684—1685.

Blecka L. J., Schaffar M., Dworschack R., 1983. Inhibitor enzyme immunoassays for quantitation of various haptens. In: Immunoenzymatic techniques, S. Avrameas, P. Druet, R. Mosseyeff and G. Feldman, Eds., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 207—214.

Bosh A. M. G., Van Hell H., Brands J., Schuurs A. H. W. M., 1978. Specificity, sensitivity and reproductibility of enzyme immunoassays. In: Enzyme labeled immunoassay of hormones and drugs, S. B. Pal, ed., Water de Gruyter, Berlin, 175—187.

Braman J. C., Broeze R. J., Bowden D. W., Myles A., Fulton T. R., Rising M., Tjurston J., Cole F., Vovis G. F. (1984). Enzyme membrane immunoassay (EMIA), Biotechnology, **2**, 349—355.

Burd J. F., Wong R. C., Feeney J. E., Carrico R. J., Boguslaki R. C. (1977). Homogeneous reactant-labeled fluorescent immunoassay for therapeutic drugs exemplified by gentamicin determintion in human serum, Clin. Chem., **23**, 1402—1408.

Butler J. E., Peterman J. H., Koertge T. E., 1985. The amplified enzyme-linked immunosorbent assay (a-ELISA), This volume.

Cais M., Dani S., Eden Y., Gandolfi O., Horn M., Isaacs E. E., Josephy Y., Saar Y., Solvin E., Snarsky L. (1977). Metalloimmunoassay, Nature, **270**, 534—535.

Castro A., Monji N., 1985. Steric hindrance enzyme immunoassay (SHEIA), This volume.

Chan S. W., Tan C. T., Hsia J. D. (1978). Spin membrane immunoassay: simplicity and specificity, J. Immunol. Meth., **21**, 185—195.

Engvall E., Perlmann P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Quantitatie assay for immunoglobulin G, Immunochem., **8**, 871—874.

Finley P. K., Williams R. J., Lichti D. A., 1980. Evaluation of a new homogeneous enzyme inhibitor immunoassay of serum thyroxine with use of a bichromatic analyser, Clin. Chem., **26**, 1723—1726.

Gibbons I., Skold C., Rowley G. L., Ullman E. F., 1980. Homogeneous enzyme immunoassay for proteins employs β-galactosidase, Anal. Biochem., **102**—167.

Glad C., Grubb A. O. (1978). Immunocapillary migration — a new method for immunochemical quantitation, Anal. Biochem., **85**, 180—187.

Gnemmi E., O'Sullivan M. J., Chieregatti G., Simmons M., Simmonds A., Bridges J. W., Mark V., 1978. A sensitive immunoenzymometric assay (IEMA) to quantitate hormones and drugs. In: Enzyme labelled immunoassay of hormones and drugs, S. B. Pal, ed., Walter de Gruyter, Berlin, 29—41.

Gonnelli M., Gabellieri E., Montagnoli G., Felicioli R. (1981). Complementig S-peptide as modulator in enzyme immunoassay, Biochem. biophys. Res. Commun., **103**, 917—923.

Greenquist A. C., Walter B., Li T. (1981). Homogeneous fluorescent immunoassay with dry reagents, Clin. Chem., **27**, 1616—1617.

Haimovich J., Sela M. (1969). Protein-bacteriophage conjugates: Application in detection of antibodies and antigens, Science, **164**, 1279—1280.

Halbert S. P., Lin T-M., 1985. Enzyme immunoassay of antibody, This volume.

Halliday M. I., Wisdom G. B., 1978. A competitive enzyme-immunoassay using labelled antibody, FEBS Letters, **96**, 298—300.

Hsu S-M., 1985. Immunoperoxidase techniques using the avidin—biotin system, This volume.

Ishikawa E., Imagawa M., Yoshitake S., Niitsu Y., Urushizaki I., Inada M., Imura H., Kanazawa R., Tachibana S., Nakazawa N., Ogawa H. (1982). Major factors limiting sensitivity of sandwich enzyme immunoassay for ferritin, immunoglobulin E, nd thyroid-stimulating hormone, Ann. Chin. Biochem., **19**, 379—384.

Ishikawa E., Yoshitake S., Endo Y., Ohtaki S. (1980). Highly sensitive enzyme immunoassay of rabbit (anti-human IgG) IgG using human IgG-β-galactosidase conjugate, FEBS Letters, **III**, 353—355.

Jaklitsch A., 1985. Separation-free enzyme immunoassay for haptens, This volume.

Kricka L. J., Carter T. J. N., 1982. Clinical and Biochemical Luminescence, Marcel Dekker, Inc., New York.

Leute R. K., Ullman E. F., Goldstein A., Herzenberg L. A. (1972). Spin immunoassay techniques for determination of morphine, Nature, **236**, 93—94.

Leuvering J. H. W., Thal P. J. H. M., Van der Waart M., Schuurs A. H. W. M. (1980). Sol particle immunoassay (SPIA), J. Immunoassay, **1**, 77—91.

Litchfield W. J., Freytag J. W., Adamich M. (1981). Highly sensitive immunoassay based on use of liposome without complement, Clin. Chem., **30**, 1441.

Litman D. J., 1985. Test strip immunoassay, This volume.

Litman D. J., Hanlon T. M., Ullman E. F. (1980). Enzyme channeling immunoassay: A new homogeneous enzyme immunoassay technique, Anal. Biochem., **136**, 223—229.

Morris D. L., Carrico R. J., Ellic P. B., Hornby W. E., Schroeder H. R., Ngo T. T., Boguslaski R. C., 1980. Colorimetric immunoassay with flavin adenine dinucleotide as label. In: Innovative approaches to clinical analytical chemistry, Lab. Professional Series, America Chemical Society.

Morris D. L., Ellis P. B., Carrico R. J., Yeager F. M., Schroeder H. R., Albarella J. P., Boguslaski R. C., Horby W. E., Rawson D. (1981). Flavin adenine dinucleotide as a label in homogeneous colorimetric immunoassays, Analyt. Chem., **53**, 658—665.
Mosback K., Mattiasson B. (1970). Matrix bound enzymes, Part 2, Studies on a matrix bound two enzyme system, Acta Chem. Scand., **24**, 2093—2100.
Nakane P., 1980. Future trends and application of immunoassay. In: Diagnostic Immunology, P. W. Keitges and R. M. Nakamura, eds., College of American Pathologists, Illinois, 73—77.
Ngo T. T. (1983). Enzyme modulator mediated immunoassay (EMMIA), Int. J. Biochem., **15**, 583—590.
Ngo T. T., 1985. Enzyme modulator as label in separation-free immunoassays: enzyme modulator mediated immunoassay (EMMIA), This volume.
Ngo T. T., 1985. Prosthetic group labeled enzyme Immunoassay, This volume.
Ngo T. T., Bovaird J. H., Lenhoff H. M. (1985). Separation-free amperometric enzyme immunoassay, Appl. Biochem. Biotechnol., **11**, 63—70.
Ngo T. T., Carrico R. J., Boguslaski R. C., 1979. Homogeneous fluorescence immunoassay for protein using β-galactosyl-umbelliferone label, paper presented at 2nd International Conference on Diagnostic Immunology, New England College, Henniber, New Hampshire.
Ngo T. T., Carrico R. J., Boguslaski R. C., Burd J. F. (1981). Homogeneous substrate-labeled fluorescent immunoassay for IgG in human serum, J. Immunol. Meth., **42**, 93—103.
Ngo T. T., Lenhoff H. M. (1980a). Enzyme modulators as tools for the development of homogeneous enzyme immunoassays, FEBS Lett., **116**, 285—288.
Ngo T. T., Lenhoff H. M. (1980b). Amperometric determination of picamolar levels of flavin adenine dinucleotide by cyclic oxidation-reduction in apoglucose oxidase system, Anal. Letters, **13**, 1157—1165.
Ngo T. T., Tunnicliff G. (1981). Inhibition of enzymic reactions by transition state analogs: An approach for drug design, Gen. Pharmac., **12**, 129—138.
Ngo T. T., Lenhoff H. M. (1981a). Recent advances in homogeneous and separation-free enzyme immunoassays, Appl. Biochem. Biotech., **6**, 53—64.
Ngo T. T., Lenhoff H. M. (1981b). New Approach to heterogeneous enzyme immunoassays using tagget enzyme-ligand conjugates, Biochem. Biophys. Res. Commun., **99**, 495—503.
Ngo T. T., Lenhoff H. M. (1982). Enzymes as versatile labels and signal amplifies for monitoring immunochemical reactions, Molec. Cell. Biochem., **44**, 3—12.
Ngo T. T., Lenhoff H. M. (1983). Antibody-induced conformational restriction as basis for new separation-free enzyme immunoassay, Biochem. Biophys. Res., **114**, 1097—1103.
Ngo T. T., Wong R. C., 1985. Fluorogenic enzyme substrate labeled immunoassays for haptens and macromolecules, This volume.
Rembaum A., Dreyer W. J. (1980). Immunomicropheres: reagents for cell labeling and separation, Science, **208**, 364—368.
Rotman B. (1961). Measurement of activity of single molecules of β-galactosidase, Proc. Nat. Acad. Sci., **47**, 1981—1991.
Rowley G. L., Rubenstein K. E., Huisjen J., Ullman E. F. (1975). Mechanism by which antibodies inhibit hapten-malate dehydrogenase conjugates, J. Biol. Chem., **250**, 3759—3766.
Rubenstein K. E., Schneider R. S., Ullman E. F. (1972). «Homogeneous» enzyme immunoassay, New Immunochemical technique, Biochem. Biophys. Res. Commun., **47**, 846—851.
Schuurs A. H. W. M., Van Weemen B. K. (1977). Enzyme immunoassay, Clinical Chim. Acta, **81**, 1—40.
Serio M., Pazzagli M., 1982. Luminescent Assays, Raven Press, New York.
Simpson J. S. A., Campbell A. K., Ryall M. E. T., Woodhead J. S. (1979). A stable chemiluminescent-labelled antibody for immunological assays, Nature, **279**, 141—147.

Singer S. J., Schick A. F. (1961). The properties of specific stains for electron microscopy prepared by the conjugation of antibody molecules with ferritin, J. Biophis. Biochem. Cytol., **9**, 519—537.
Soini E., Hemmila I. (1979). Fluoroimmunoassay: Present status and key problems, Clin. Chem., **25**, 353—361.
Tyhach R. J., Rupchock P. A., Pendergrass J. H., Shjold A. C., Smith P. J., Johnson R. D., Albarrella J. P., Profitt J. A. (1981). Adaptation of prosthetic-group-label homogeneous immunoassay to reagent-strip format, Clin. Chem., **27**, 1499—1504.
Van Weemen B. K., Schuurs A. H. W. M. (1971). Immunoassay using antigen enzyme conjugates, FEBS Letters, **15**, 232—236.
Wicks R., Usategui-Gomez M., 1985. Development of immunochemical enzyme assay for cardiac isoenzymes, This volume.
Wong R. C., Burd J. F., Carrico R. J., Buckler R. T., Thoma J., Boguslaski R. C. (1979). Substrate-labeled fluorescent immunoassay for phenytoin in human serum, Clin. Chem., **25**, 686—691.
Yalow R. S. (1980). Radioimmunoassay. In: Rev. Biophys. Bioeng. (ed. by Mullins L. J., Hagins W. A., Newton C. and Weber G.), Annual Reviews Inc., Palo Alto, **9**, 327—345.
Yalow R. S., Berson S. A. (1959). Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods, Nature, **184**, 1648—1649.

Часть I. ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ БЕЗ РАЗДЕЛЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ (гомогенный анализ)

Глава 3

Определение гаптенов с помощью иммуноферментного анализа без разделения компонентов

А. Яклич

Методы ИФА без разделения компонентов (гомогенные методы EMIT^R от англ. Enzyme Multiplied Immunoassay Technique) впервые были разработаны в Исследовательском институте Syva в начале 1970-х годов. Было найдено, что присоединение специфических антител к конъюгату [лекарственное вещество—фермент] модулирует (ингибирует или активирует) каталитическую функцию. Следовательно, возможен конкурентный иммуноанализ, в котором лекарственное вещество из исследуемого образца и лекарственное вещество, меченное ферментом, конкурируют за антитела. Модуляцию ферментативной активности, прямо пропорциональную концентрации определяемого вещества, контролируют без отделения связанных антител от свободных. Впоследствии этот принцип, распространенный на разные ферменты, был использован для определения гормонов (Ullman et al., 1979) и белков (Gibbons et al., 1980).

В первых поступивших в продажу наборах для контроля дозировки лекарственных препаратов по их содержанию в моче меткой служил лизоцим (Rubenstein et al., 1972). Позже на основе использования глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы (Г6ФДГ) (Rowley et al., 1976) и малатдегидрогеназы (МДГ) (Ullman et al., 1979) были разработаны методы количественного определения лекарственных препаратов и эндогенных веществ в сыворотке. В последнее время вместо методов, связанных с применением лизоцима, предложены модифицированные методы на основе Г6ФДГ, позволяющие упростить и стандартизировать анализ EMIT^R (табл. 3-1).

Таблица 3-1. Стандартная методика EMIT-анализа[1)]

1. Предварительно разбавьте 50 мкл образца с помощью 250 мкл буфера[2)]
2. Смешайте 50 мкл разбавленного образца и 250 мкл буфера
3. Прибавьте 50 мкл реагента А[3)] и 250 мкл буфера
4. Прибавьте 50 мкл реагента Б[4)] и 250 мкл буфера
5. Пропустите через проточную ячейку спектрофотометра (30 °С)
6. Отметьте изменение поглощения при 340 нм между 15-й и 45-й секундами (длина оптического пути 1 см)

[1)] При контроле дозировки лекарственных препаратов разбавлять образцы не нужно.
[2)] Состав буфера: 0,055 М трис-HCl, pH 8,0; 0,9%-ный NaCl; 0,01%-ный тритон Х-100.
[3)] Реагент А содержит антитела, субстрат, кофакторы и консерванты в 0,055М трис-HCl, pH 5,2. В состав реагента А входят 0,066 М глюкозо-6-фосфат и 0,04 М NAD.
[4)] Реагент Б содержит ферментный конъюгат, 0,055 М трис-HCl, pH 6,2 или 8,0, стабилизирующие агенты и консерванты.

Таблица 3-2. EMIT-анализ

А. Терапевтический анализ сыворотки

Амикацин[1]	Карбамазепин
Гентамицин[1]	Вальпроевая кислота
Нетилмицин[1]	Дигоксин
Тобрамицин[1]	Лидокаин[1]
Метотрексат	Прокаинамид[2]
Фенитоин[1]	N-Ацетилпрокаинамид[2]
Люминал[1]	Хинидин[1]
Примидон[2]	Дизопирамид
Этосукцимид	

Б. Анализ гормонов

Тироксин (метод CFA для системы «CentrifiChem», модель 300 или 400; метод ABA для системы «Abbot Bichromatic Analyzer 100»; метод для анализа вручную с помощью системы «EMIT^R Lab 6000»)
Кортизол (автоматический анализ)

В. Токсикологический анализ сыворотки

Бензодиазепин
Барбитурат
Трициклические антидепрессанты
Ацетаминофен[2]

Г. Токсикологический анализ мочи

Опиаты[3]	Пропоксифен
Амфетамин[3]	Метаболиты кокаина
Барбитурат[2]	Фенциклидин[3]
Метадон[3]	Каннабиноиды
Метаболиты бензодиазепина[3]	Метаквалон[2]

[1)] Выпускаются наборы для количественного анализа (EMIT^R Qst^{TM}), содержащие разовые порции порошкообразной смеси реагентов.
[2)] Разовые порции смеси реагентов (Qst) выпускаются с 1985 г.
[3)] Выпускаются наборы для качественного анализа, содержащие разовые порции порошкообразной смеси реагентов.

В этой главе мы рассмотрим принцип анализа гаптенов без разделения компонентов (т. е. гомогенного анализа). В табл. 3-2 перечислены вещества, которые были определены этим методом. Будут описаны также альтернативные варианты анализа. Мы обсудим методы, предназначенные для обнаружения целых классов лекарственных веществ, на примере определения бензодиазепина и качественного анализа трициклических антидепрессантов. При рассмотрении типичных методов этой группы, разработанных для определения аминогликозидов, будут показаны пути оптимизации количественного анализа лекарственных препаратов, включая химический анализ и обработку

данных. Мы приведем также несколько методик для измерения низких концентраций веществ и расскажем о перспективах использования метода.

Принцип анализа

Субстрат для иммуноанализа с помощью лизоцима представляет собой суспензию клеток *M. luteus*. Разрушение клеточных стенок бактерий приводит к уменьшению мутности, которую измеряют по пропусканию при 436 нм. Присоединение антител к конъюгату [лизоцим — производное лекарственного вещества] ингибирует ферментативную активность, что, вероятно, обусловлено стерическим исключением субстрата (Rubenstein et al., 1972). Поскольку лекарственное вещество из образца конкурирует за антитела с лекарственным веществом,

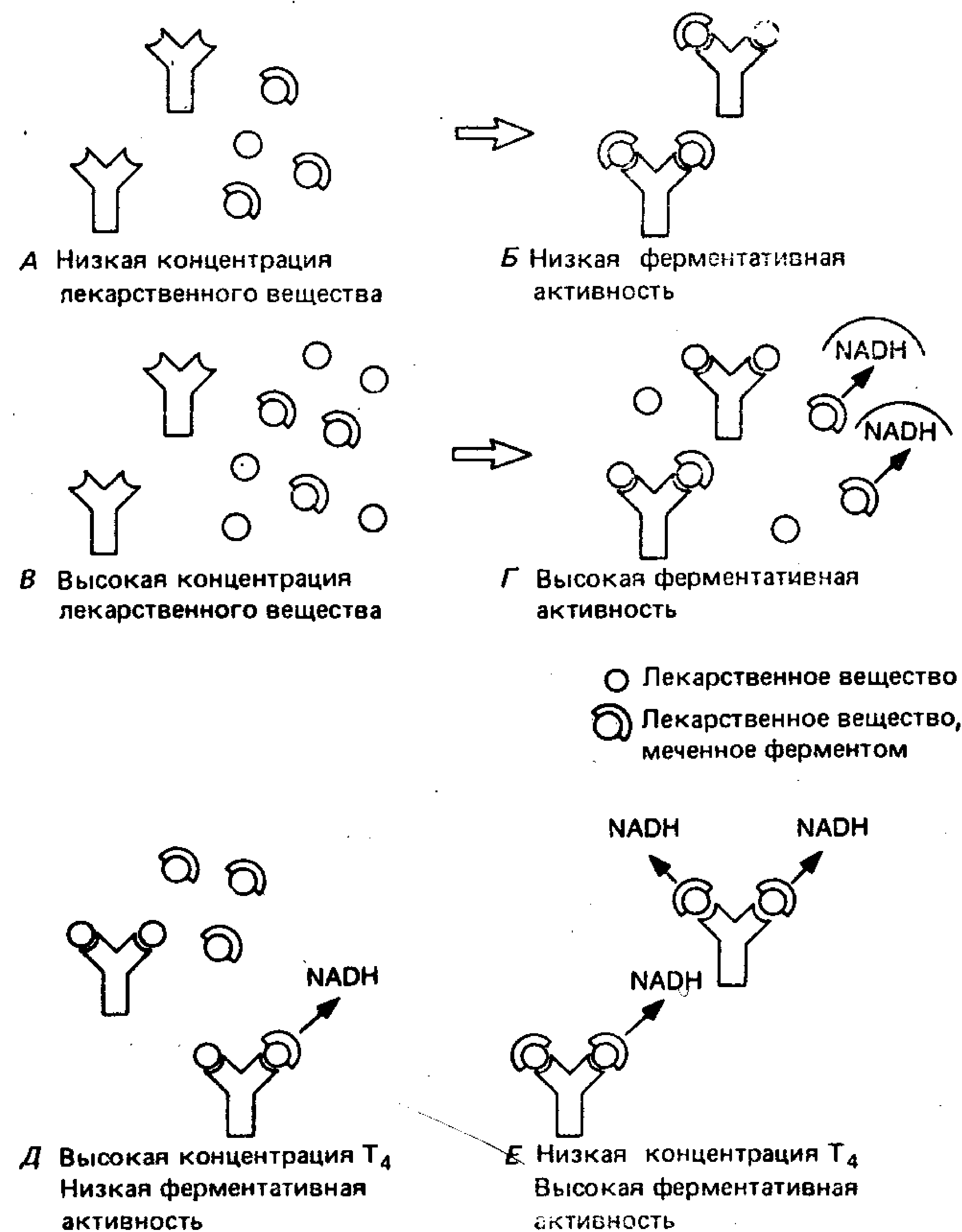


Рис. 3-1. Принцип EMIT[R]-анализа.

связанным с ферментной меткой, степень ингибирования уменьшается, т. е. ферментативная активность и мутность при 436 нм изменяются пропорционально концентрации определяемого лекарственного вещества.

В иммуноанализе с помощью Г6ФДГ также используют производные лекарственного вещества, связанные с ферментом. Присоединение антител против лекарственного вещества ингибирует активность конъюгата [лекарственное вещество — фермент] вследствие изменения конформации фермента. Как и в анализе с помощью лизоцима, лекарственное вещество из образца и ферментный конъюгат конкурируют за антитела к лекарственному веществу, причем остаточная ферментативная активность прямо пропорциональна концентрации лекарственного вещества в образце (рис. 3-1, *А—Г*). Ферментативную активность удобно измерять по образованию NADH, сильно поглощающего при 340 нм (Rowley et al., 1976).

В EMIT[R]-анализе тироксина (T_4) в качестве метки используют малатдегидрогеназу (МДГ). Активность конъюгата МДГ—T_4 возрастает в присутствии антител к T_4 (рис. 3-1, *Д*, *Е*) (Ullman et al., 1979). Поэтому калибровочная кривая в этом случае показывает, что ферментативная активность уменьшается с возрастанием концентрации тироксина в сыворотке пациента (Jaklitsch et al., 1976).

Контроль дозировки лекарственных препаратов (токсикологический анализ мочи)

Методы контроля дозировки лекарственных препаратов предназначены для их обнаружения, а не для определения концентрации. Каждый такой метод позволяет обнаружить группу сходных по строению лекарственных веществ и их метаболитов. Рис. 3-2 иллюстрирует структурное сходство широко распространенных бензодиазепинов. EMIT[R]-анализ построен таким образом, что любое из этих соединений вызывает примерно одинаковый сигнал. Например, проба на бензодиазепины дает положительный ответ, когда концентрация флуразепама или его метаболита — дезалкилфлуразепама — превышает 2 мкг/мл. Это достигается благодаря связыванию лекарственного производного с белком-носителем через функциональную группу, природа которой у соединений этого класса различна (рис. 3-2). Следовательно, антитела вырабатываются против той части бензодиазепинового ядра, которая у родственных лекарственных препаратов имеет одинаковое строение.

Реакцию анализируемого образца сравнивают с отрицательной реакцией нормальной мочи и положительной реакцией стандартного раствора. Для получения стандартного раствора

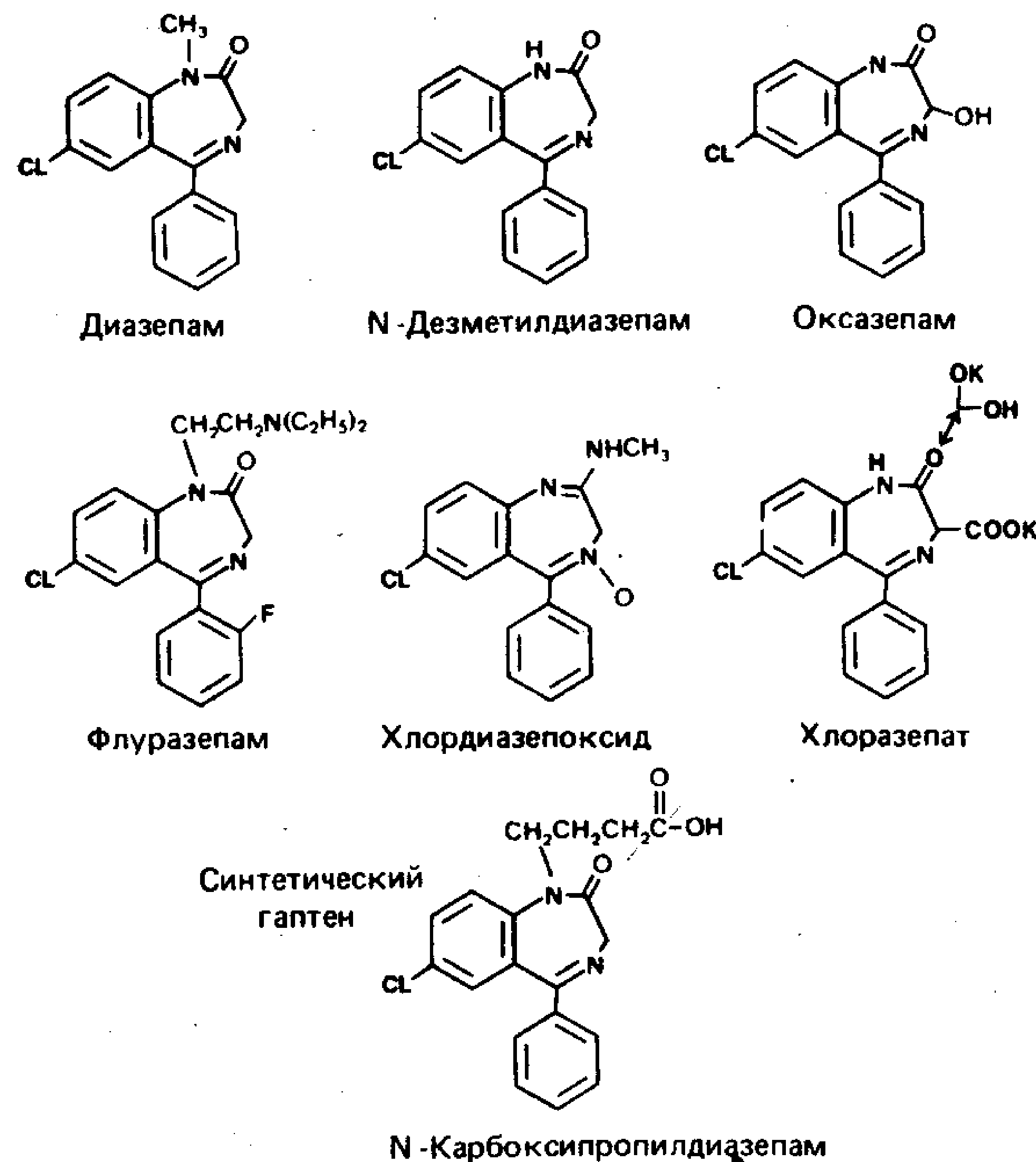


Рис. 3-2. Структурное сходство бензодиазепинов.

добавляют известное количество лекарственного вещества, характерного для данного класса, к нормальной моче. Образец, вызывающий такое же изменение поглощения, что и стандартный раствор, или большее, считают положительным, а меньшее — отрицательным; во втором случае образец либо вообще не содержит лекарственного вещества, либо содержит его в низкой концентрации, не обнаруживаемой при анализе.

Кроме описанного выше способа выполнения анализа разработан вариант, в котором те же реагенты используют в виде готовой смеси (Centofanti et al., 1981). Фермент, антитела, субстрат, буферы и стабилизирующие агенты лиофилизуют и затем смешивают, получая конечный продукт. В пробирки помещают по одной порции порошка. В одну из пробирок добавляют анализируемый образец, а в другую — стандартный раствор. Разбавляют обе смеси водой, энергично встряхивают, помещают в специальный спектрофотометр и измеряют поглощение непосредственно в пробирке в течение 90 с. Исследуемый и стандартный образцы сравниваются автоматически. Образец считают положительным, если он дает не меньший сигнал, чем стандартный раствор, и отрицательным — в противном случае. Этот метод анализа разработан для тестирования вне лаборатории.

Токсикологический анализ сыворотки

Методы анализа, позволяющие определять целые классы лекарственных препаратов, удобно использовать в пунктах неотложной помощи, когда нужно узнать суммарное количество принятых лекарств. Его оценивают путем сравнения реакции анализируемого образца с реакцией типичного представителя группы лекарственных веществ и затем выражают найденную величину в виде суммарного лекарственного эквивалента.

Иногда пациенты попадают в пункт неотложной помощи в таком состоянии (сознательном или бессознательном), что собрать мочу для анализа труднее, чем получить сыворотку. Поэтому были созданы методы группового анализа лекарственных препаратов в сыворотке: барбитуратов, бензодиазепинов и совсем недавно — трициклических антидепрессантов.

При анализе антидепрессантов существенны реактивность организма и число метаболитов, причем глюкурониды определению не поддаются. Суммарное количество трициклических соединений в образце можно оценить лишь приблизительно. В этом случае возможен положительный контроль, показывающий, укладывается ли общее количество исходного лекарственного вещества и метаболитов в терапевтические пределы или

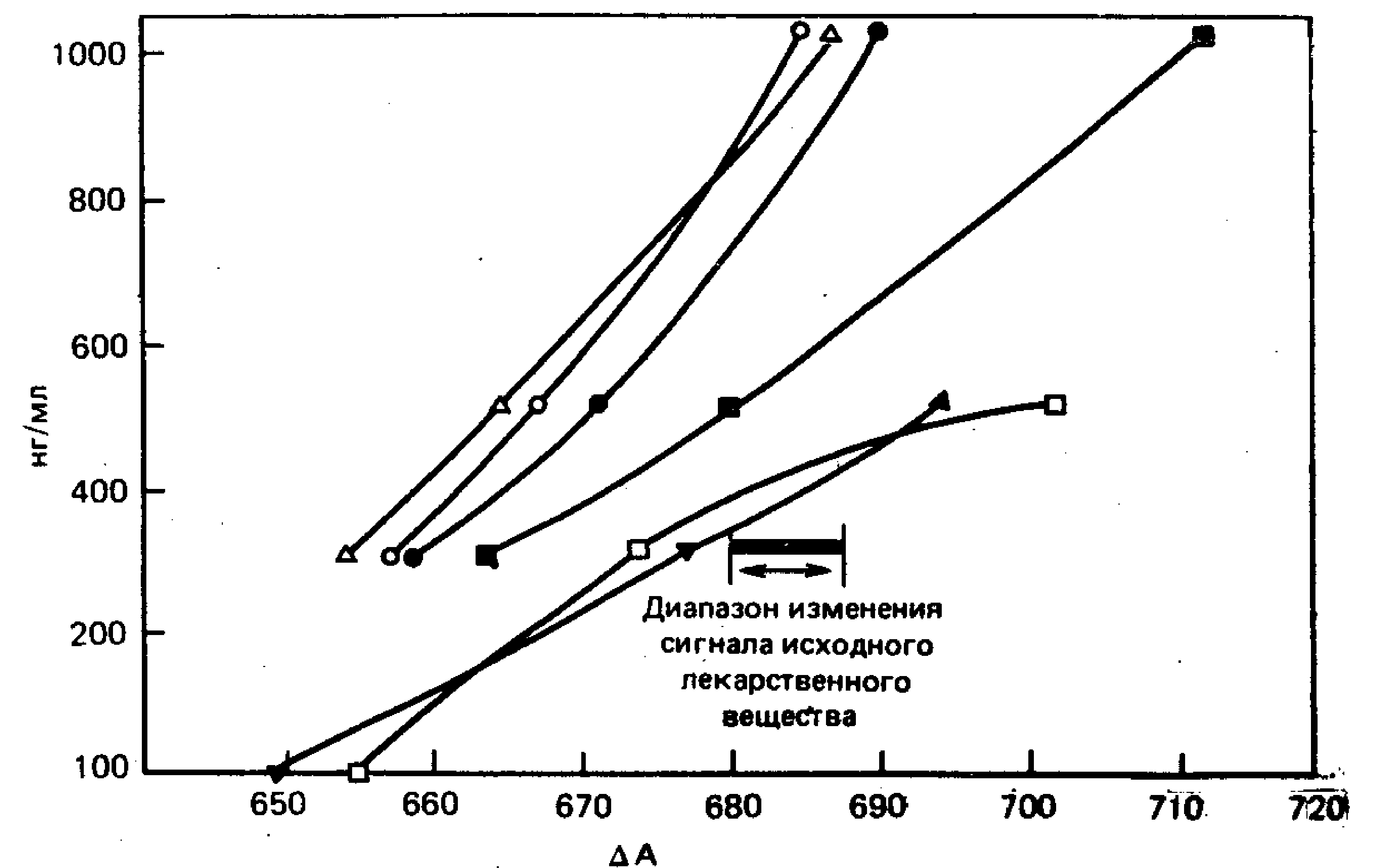


Рис. 3-3. Аналитические сигналы близких по строению веществ при токсикологическом анализе трициклических соединений. Сигнал каждого лекарственного вещества получали по обычной методике EMIT[R]. Темные кружки — 10-OH-амитриптилин; светлые кружки — 10-OH-имипрамин; темные треугольники — 2-OH-имипрамин; светлые треугольники — 2-OH-дезипрамин; темные квадраты — хлорпромазин; светлые квадраты — протриптилин, хломипрамин.

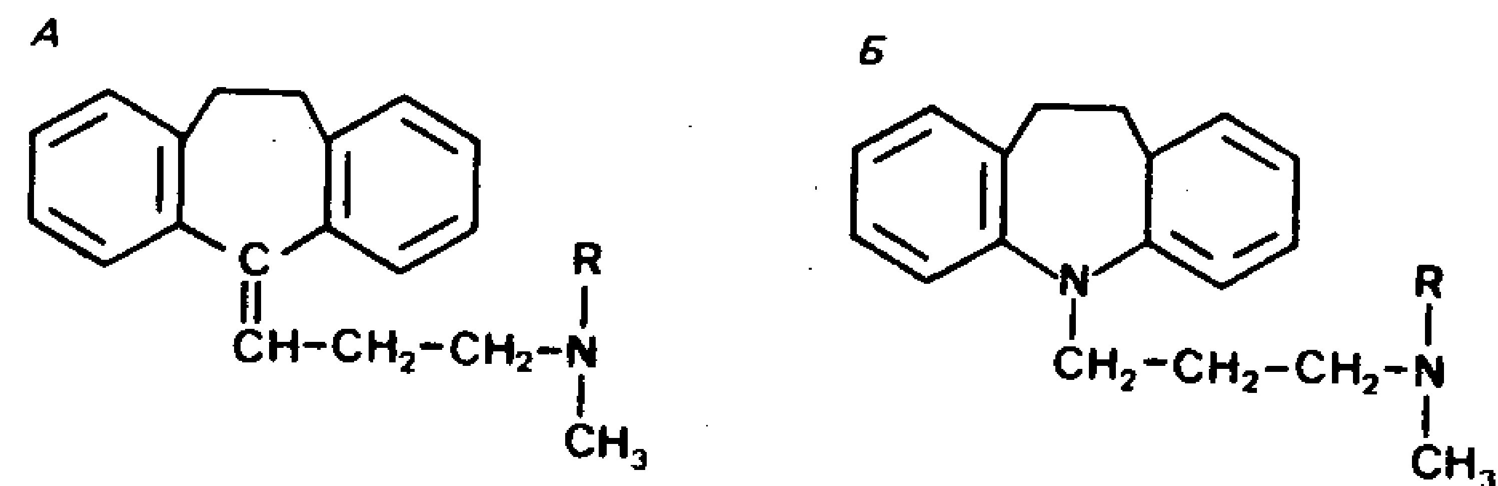


Рис. 3-4. Строение трициклических антидепрессантов и иммуногена, используемого в качественном токсикологическом анализе. *А*. R=CH_3 — амитриптилин; R=H — нортриптилин. *Б*. *R*=CH_3 — имипрамин; R=H — дезипрамин; R=$CH_2CH_2CH_2COOH$ — иммуноген.

же превышает их. На рис. 3-3 показано, какой ответ дают метаболиты в этом методе.

Исходное лекарственное вещество и деметилированные метаболиты дают примерно одинаковый сигнал. Этот результат был достигнут при использовании антисыворотки барана, которого иммунизировали дезипрамином, соединенным N-карбоксипропильной связью с белком-носителем — бычьим сывороточным альбумином. Наружу в этом конъюгате обращена циклическая структура, поэтому реакция вырабатываемой антисыворотки малочувствительна к заместителям в боковой цепи (рис. 3-4).

Разработан специальный EMIT-метод для количественного анализа ацетаминофена, позволяющий установить, нужно ли вводить противоядие, а также предсказать его эффективность при лечении опасных для жизни передозировок лекарственного препарата. Период полувыделения из организма вычисляют на основе анализа двух образцов сыворотки, полученных с интервалом в несколько часов.

Контроль лекарственных препаратов

Цель

Теперь уже общепризнано, что контроль лекарственных препаратов, обладающих лечебным действием в узком диапазоне концентраций, очень полезен. Хотя существует много недорогих и точных методов анализа, было показано, что только 42 из 145 исследованных образцов теофиллина (29%) количественно соответствуют терапевтическому диапазону 10—20 мкг/мл, а среди образцов фенитоина в терапевтические пределы попадает еще меньшая часть — 18% (Whiting et al., 1984). Когда лечащих врачей срочно проинформировали об этих важных результатах, а дозировку лекарственных препаратов начали подбирать строже, в терапевтические пределы стали укладываться 70% образцов теофиллина и 45% образцов фенитоина. Очевидно, что для обеспечения контроля лекарственных средств и максимального улучшения обслуживания больных необходимо расширить связи между врачами и лабораториями.

Методика анализа

Большинство EMIT^R-анализов проводят по одной и той же методике с помощью полуавтоматической системы «Syva Lab 5000» (табл. 3-1). Методика «Syva Autocarousel™», отличается только тем, что не требует предварительного разбавления образцов: анализируют непосредственно 8 мкл сыворотки. На основе этих же реагентов разработано множество вариантов анализа, позволяющих применять другие приборы, например «Centrifi Chem» (Dols, van Zanten, 1981), «IL Multistat» (Iosefsohn et al., 1981), «Cobas Bio» (Ou et al., 1981; Oellerich et al., 1982; Witebsky et al., 1983; Hamlin, Sullivan, 1984). Благодаря тому что химический принцип анализа можно реализовать на разных приборах, метод EMIT^R получил широкое признание.

Кроме только что упомянутых методов разработаны варианты количественного определения с использованием разовых порций (Qst) (табл. 3-2). В системе Qst специальное приспособление разбавляет образцы, перемешивает и автоматически пропускает через ячейку спектрофотометра. На количественный анализ затрачивается 1 мин.

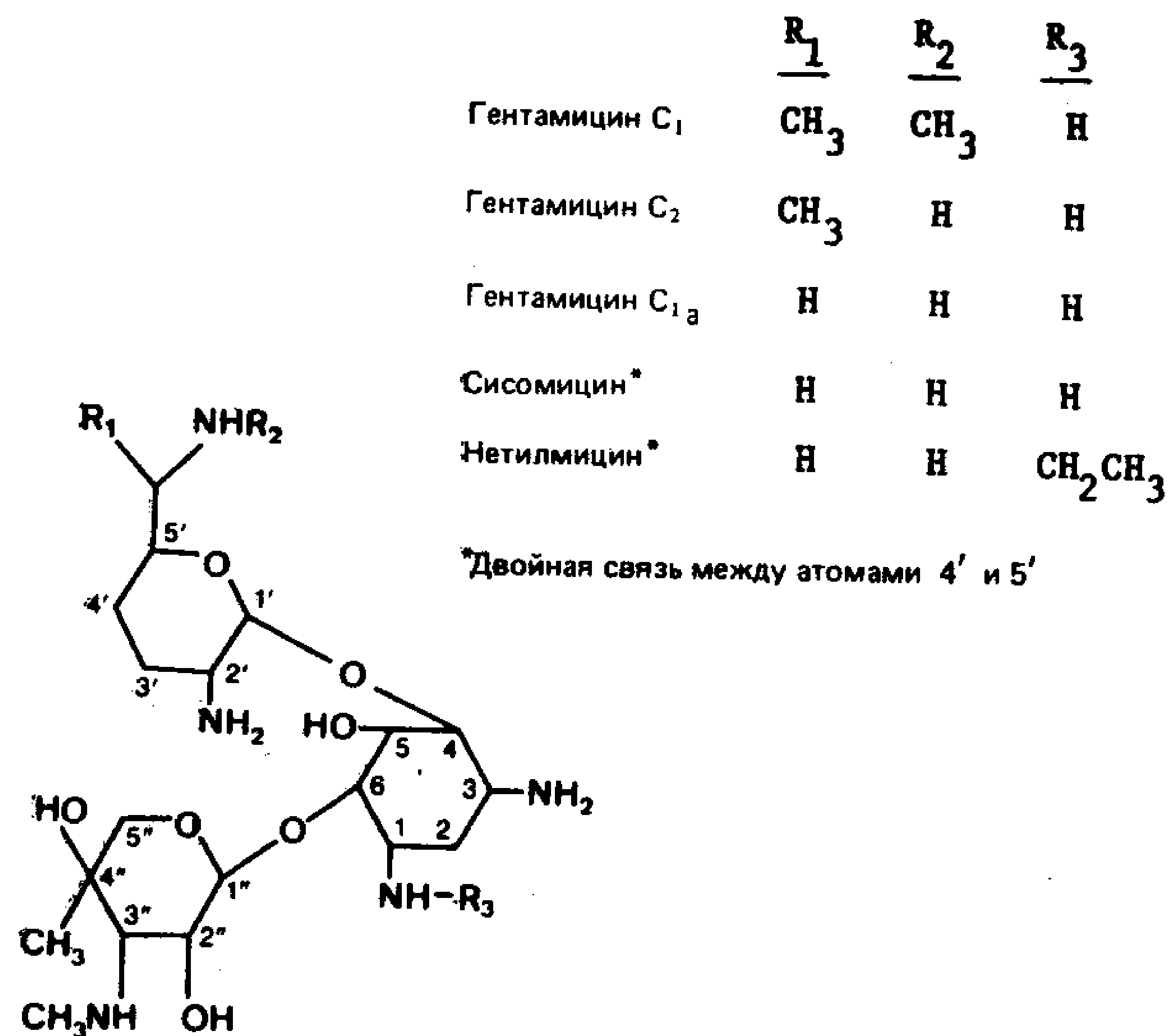
Разработка EMIT-методов

Конъюгаты гаптенов, обладающих лечебным действием

Для получения иммуногенов или конъюгатов лекарственных веществ с ферментами мы, как правило, используем один из двух путей синтеза. Самый простой путь сходен со способом присоединения 3(карбоксипропил)теофиллина к Г6ФДГ на основе активации N-гидроксисукцинимидом в присутствии конденсирующего агента, например дициклогексилкарбодиимида (Chang et al., 1982). В случае аминогликозидов, обладающих особыми химическими свойствами, нужен совсем другой подход к синтезу, описанный в первоначальном варианте анализа гентамицина (Singh, 1980). Аминогруппы Г6ФДГ модифицируют бромацетилглицином, получая в качестве промежуточного соединения N-гидроксисукцинимидный эфир. Затем модифицированный фермент соединяют с сульфгидрильным производным аминогликозида. Бром вытесняется, а между лекарственным веществом и модифицированным ферментом образуется ковалентная связь.

Оптимизация анализа

В этом разделе мы опишем некоторые трудности, с которыми столкнулись при выяснении пригодности метода для анализа группы типичных аминогликозидов. Строение этих соединений показано на рис. 3-5 и 3-6. При разработке метода было



	R_1	R_2	R_3
Гентамицин C_1	CH_3	CH_3	H
Гентамицин C_2	CH_3	H	H
Гентамицин C_{1a}	H	H	H
Сисомицин*	H	H	H
Нетилмицин*	H	H	CH_2CH_3

*Двойная связь между атомами 4′ и 5′

Рис. 3-5. Строение аминогликозидных антибиотиков.

	R_1	R_2	R_3	
Тобрамицин	H	NH_2	H	
Канамицин A	OH	OH	H	95%
Канамицин B	OH	NH_2	H	5%
Амикацин	OH	OH	$HCOCONHCH_2CH_2NH_2$	

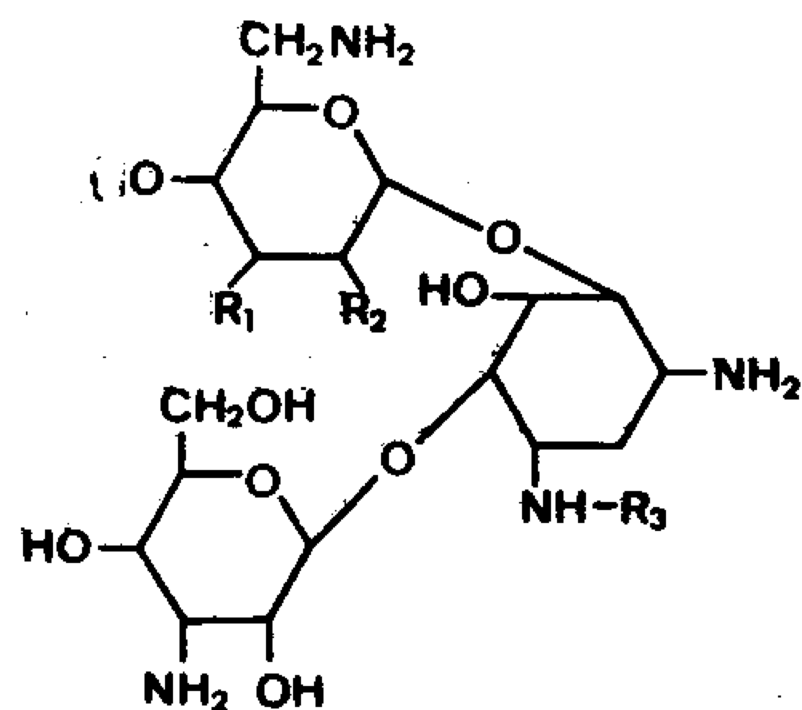


Рис. 3-6. Строение аминогликозидных антибиотиков.

сделано много интересных наблюдений. Хотя не все они получили исчерпывающее объяснение, необычные проблемы, возникшие перед нами, были решены. Сравнительно небольшие структурные различия между веществами внутри групп гентамицина и тобрамицина позволили изучить зависимость аналитического сигнала от природы аминогликозида, антител и фермента, используемых в анализе. Мы укажем также, какие свойства аминогликозидов влияют на проведение анализа.

Гентамицин, нетилмицин и сисомицин

Как видно из рис. 3-5, структуры гентамицина, нетилмицина и сисомицина различаются только кратностью связи между атомами 4′ и 5′ в пупурозаминовом кольце, а также тем, что у нетилмицина атом водорода при первом атоме азота в 2-дезоксистрептаминовом кольце замещен на этильную группу.

Эти структуры настолько близки, что в анализе нетилмицина можно использовать антисыворотку против конъюгата производного гентамицина с белком-носителем и ферментный конъюгат либо нетилмицина (непа́рная система), либо гентамицина (па́рная система). Различие между сигналами стандартных растворов нетилмицина с концентрациями 1 и 7 мкг/мл больше в случае непа́рной системы (200 условных единиц против 125 для па́рной системы).

Определение сисомицина также можно провести с помощью любого из этих двух ферментных конъюгатов (Jaklitsch et al., 1980). При использовании антисыворотки к гентамицину чувствительность измерения сисомицина в концентрации 4—8 мкг/мл примерно на 30% выше, чем при измерении нетилмицина. Возможно, это вызвано тем, что иммуноген гентамицина больше похож по своему строению на сисомицин, чем на нетилмицин. По-видимому, структурное сходство способствует более успешной конкуренции лекарства с ферментным конъюгатом за антитела, а это приводит к увеличению чувствительности анализа.

Влияние стадии инкубации образца с антителами было изучено на примере нетилмицина. Калибровочная кривая для парной системы, содержащей конъюгат нетилмицина с ферментом и антитела против нетилмицина, поднимается круче при больших концентрациях лекарственного вещества, если методика включает инкубацию в течение 30 с. В то же время сигнал уменьшается и приобретает линейный характер при добавлении к антителам лекарственного вещества в концентрации 1 мкг/мл. Эти явления отражены на рис. 3-7. Таким образом, добавление лекарственного вещества к антителам может служить экспериментальным способом изменения формы кривой. Результаты EMIT^R-анализа выражают в единицах концентрации путем сопоставления реакции исследуемого образца с калибровочной

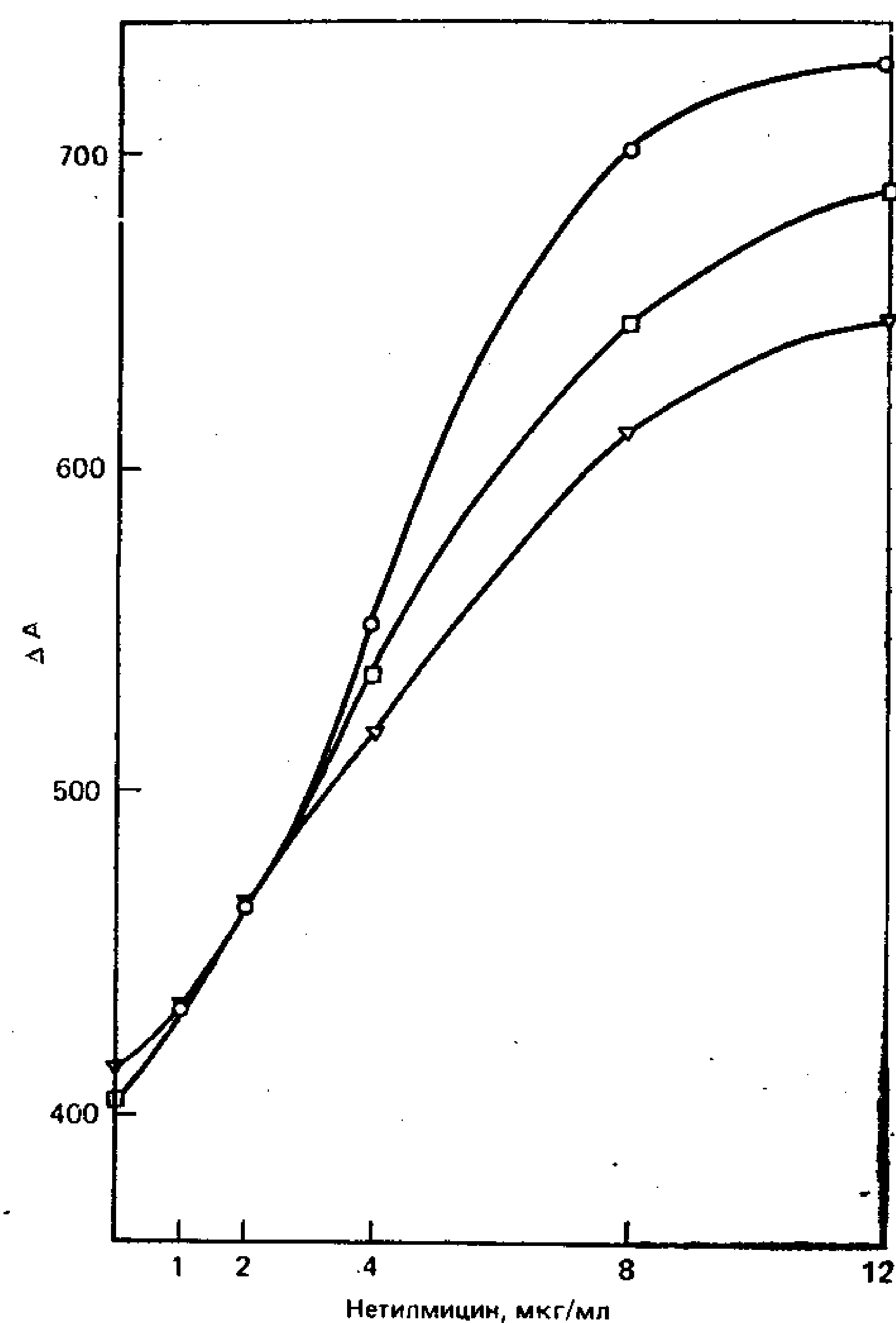


Рис. 3-7. **Зависимость формы калибровочной кривой для определения нетилмицина от времени инкубации с антителами и от состава реакционной смеси. Кружки — стандартная методика: инкубация образца с антителами в течение 30 с; квадраты — без инкубации; треугольники — без инкубации, к антителам добавляли нетилмицин (1 мкг/мл).**

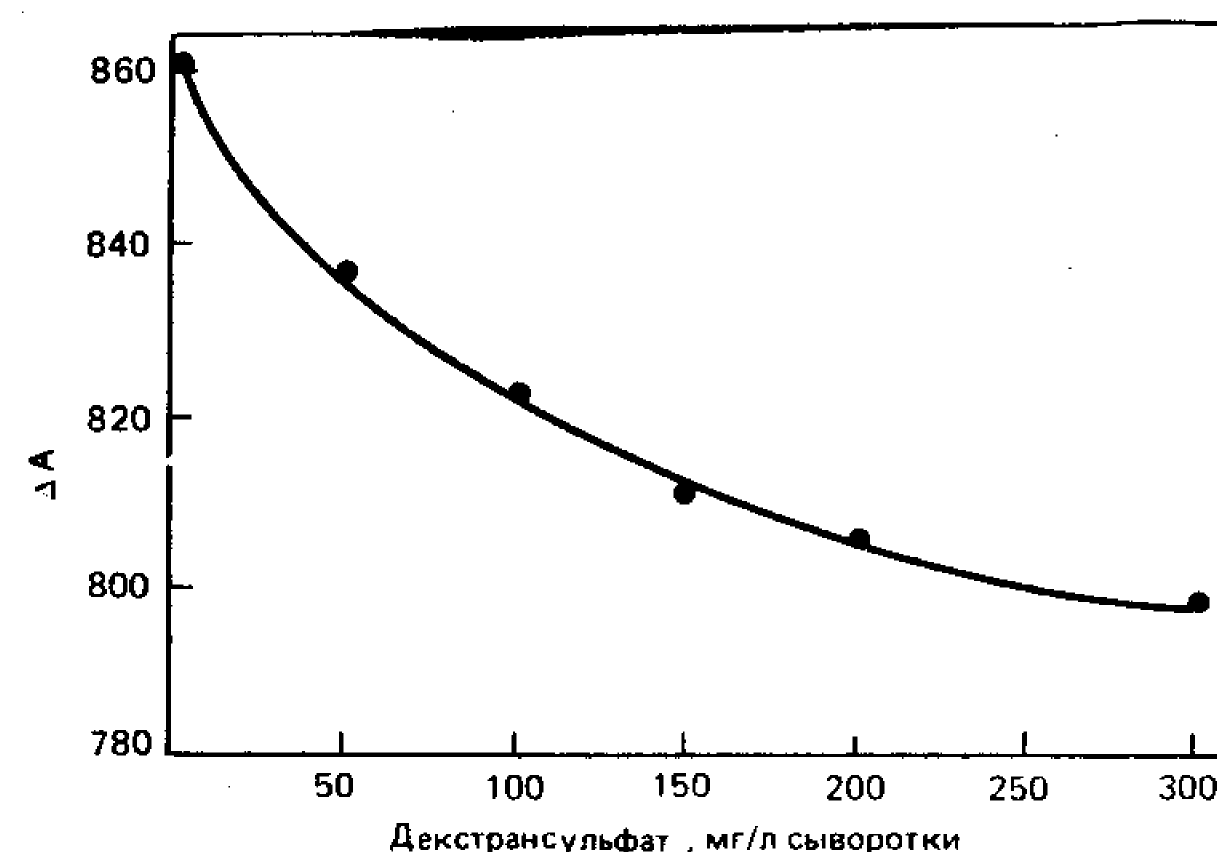


Рис. 3-8. Влияние декстрансульфата на ферментативную активность Г6ФДГ. Декстрансульфат добавляли к необработанной бараньей сыворотке для осаждения сывороточных липопротеинов в присутствии ацетата кальция. Осадок удаляли центрифугированием. При анализе гентамицина вместо сыворотки барана использовали калибровочный раствор. Согласно стандартной методике, изменение поглощения NAD при 340 нм регистрировали при 30 °С в течение 30 с после инкубации продолжительностью 15 с.

кривой. Стандартные образцы для ее построения выпускает и утверждает фирма Syva.

Для изучения способности аминогликозидов соединяться с анионными полимерами, такими, как декстрансульфат, добавляли этот полимер к сыворотке, содержащей конъюгат гентамицина с Г6ФДГ. Как показано на рис. 3-8, конъюгат ингиби-

Таблица 3-3. Потери гентамицина со временем в присутствии карбенициллина

Время	Гентамицин, мкг/мл	Потери, %
0	7,8	
1 ч (комнатная температура)	7,2	7,7
15 ч (2—8 °С)	5,7	26,9
1 нед (2—8 °С)	3,4	56,4

руется декстрансульфатом. Поэтому можно ожидать, что отрицательно заряженные полимеры, например гепарин, будут мешать определению аминогликозидов, являющихся поликатионными соединениями. И действительно, такой эффект наблюдали при анализе гентамицина (Krogsted et al., 1982) и тобрамицина (Matzke et al., 1984). Следовательно, плазму, содержащую гепарин, нельзя использовать для EMIT[R]-анализа аминогликозидов, а сыворотку, обработанную декстрансульфатом, нельзя применять для калибровки.

Имеющиеся в литературе сведения о неустойчивости аминогликозидов в присутствии β-лактамных антибиотиков стимулировали изучение условий получения и хранения образцов, которые могут содержать как β-лактамы, так и аминогликозиды. В своей обстоятельной работе Тиндула и др. (Tindula et al., 1983) показали, что реакционная способность по отношению к β-лактамным соединениям изменяется в следующем порядке: тобрамицин > гентамицин > амикацин. Авторы нашли также, что наиболее активны среди β-лактамных соединений пенициллин, ампициллин, карбенициллин и тикарциллин. Самый плохой результат получен при взаимодействии тобрамицина с карбенициллином, когда после выдерживания смеси при комнатной температуре в течение 24 ч осталось лишь 53% исходного количества тобрамицина. В табл. 3-3 показана инактивация гентамицина со временем, установленная с помощью EMIT[R]-анализа. Из приведенных здесь данных следует, что образцы, содержащие аминогликозиды, необходимо хранить в замороженном состоянии сразу же после поступления в лабораторию.

Тобрамицин, амикацин и канамицин

Рис. 3-6 иллюстрирует структурное сходство аминогликозидов, благодаря которому антисыворотки против этих лекарственных веществ при выполнении анализа взаимозаменяемы. Одна из целей отработки схемы анализа амикацина состояла

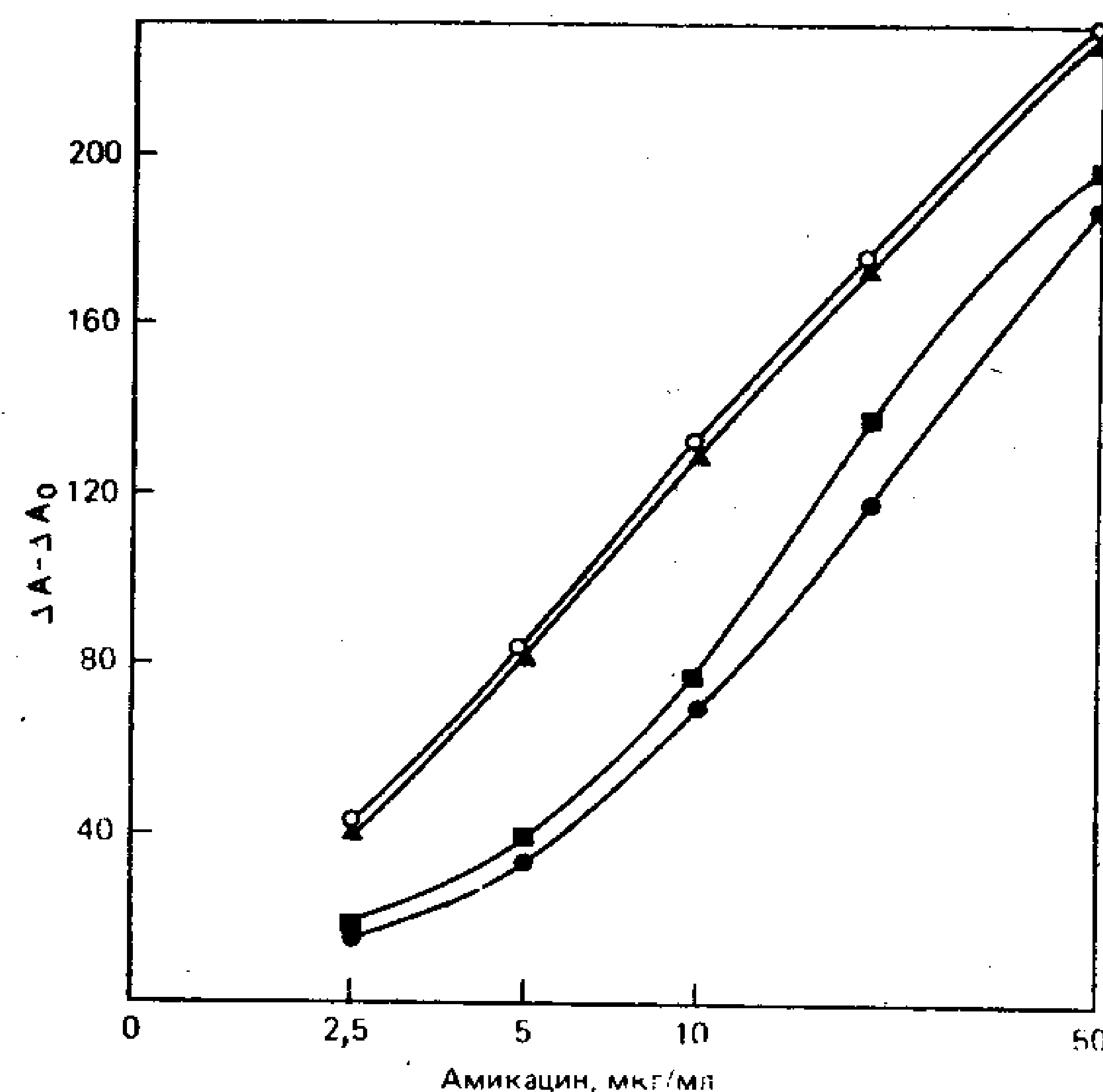


Рис. 3-9. Определение амикацина с помощью антисывороток против амикацина и тобрамицина. Анализ проводили по стандартной методике EMIT[R] (табл. 3-1) с помощью конъюгата [фермент — амикацин]. Светлые кружки — инкубация образца с антителами против тобрамицина в течение 30 с. Темные треугольники — использование антител против тобрамицина без инкубации. Темные квадраты — инкубация образца с антителами против амикацина в течение 30 с. Темные кружки — использование антител против амикацина без инкубации.

в сравнении антисывороток против тобрамицина и амикацина. Как показывает рис. 3-9, для анализа можно применять любую из них. Хотя при использовании антисыворотки против тобрамицина зависимость аналитического сигнала от концентрации лекарственного вещества меньше отклоняется от линейной, а продолжительность инкубации не играет существенной роли, для EMIT[R]-анализа амикацина мы предпочли использовать антисыворотку против амикацина. Это было сделано по следующим причинам. Иногда, убедившись в неэффективности лечения тобрамицином, врачи назначают больным амикацин—антибиотик с широким спектром действия. У больных, страдающих уремией, почечное очищение (клиренс) затруднено (Lockwood, Bower, 1973), поэтому период полувыведения лекарства возрастает. В результате тобрамицин может еще оставаться в крови, когда ее берут для количественного анализа амикацина. Следовательно, определение амикацина с помощью антисыворотки к тобрамицину может давать большую ошибку. Чтобы этого избежать, мы использовали пáрную систему, содержащую меченный ферментом амикацин и антитела против амикацина.

Характеристики анализа амикацина могут сильно зависеть от времени инкубации образца с антителами, так как оно существенно влияет на величину сигнала (см. рис. 3-9). Мы нашли два подхода, позволяющих предотвратить снижение точности анализа. Проще всего изменить методику и добавлять антитела к смеси образца с ферментным конъюгатом. Сигнал приближается при этом к линейному, а связывание лекарственного вещества с антителами перестает зависеть от времени инкубации. Мы установили также, что зависимость сигнала от

Таблица 3-4. Влияние природы антител на результаты анализа

Антитела	Инкубация антител с образцами (ΔA)[1]		ΔA_{30}[2]—ΔA_0[3]
	0 с	30 с	
Поликлональные			
без амикацина	460	462	2
с добавлением амикацина (10 мкг/мл)	695	713	18
Клон 4Н6			
без амикацина	421	424	3
с добавлением амикацина (10 мкг/мл)	765	769	4
Клон 12С6			
без амикацина	417	423	6
с добавлением амикацина (10 мкг/мл)	785	787	2

[1]) ΔA — изменение поглощения при использовании стандартной методики.
[2]) ΔA_{30} — изменение поглощения при инкубации образца с антителами в течение 30 с.
[3]) ΔA_0 — изменение поглощения без инкубации образца с антителами.

продолжительности инкубации определяется природой специфических антител. Представленные в табл. 3-4 данные показывают, что инкубация в течение 30 с без добавления лекарственного вещества не отражается на величине сигнала при использовании как поликлональных, так и моноклональных антител. При добавлении амикацина (10 мкг/мл) сигнал зависит от времени только в случае поликлональной антисыворотки. Таким образом, подобрав подходящие антитела, можно устранить зависимость аналитического сигнала от времени инкубации.

В анализе канамицина также можно использовать реагенты на основе тобрамицина, амикацина или канамицина (рис. 3-10). Наилучший результат получен с помощью непáрной системы. Самый слабый сигнал дает система на основе амикацина; по всей вероятности, это объясняется тем, что антитела легче распознают боковую цепь амикацина, чем антигенные детерминанты канамицина, лишенного длинной боковой цепи. Тобрамицин меньше отличается от канамицина, чем амикацин, однако можно предположить, что антитела против тобрамицина сильнее связываются с конъюгатом тобрамицина, чем с канамицином. Следовательно, и в этой пáрной системе свободный лекарственный препарат проигрывает в конкуренции за антитела. В пользу этих предположений говорят некоторые данные, известные из литературы (Deleide et al., 1979). При определении люминала и фенитоина максимальное ингибирование фермента и, следовательно, оптимальный сигнал наблюдаются при разной

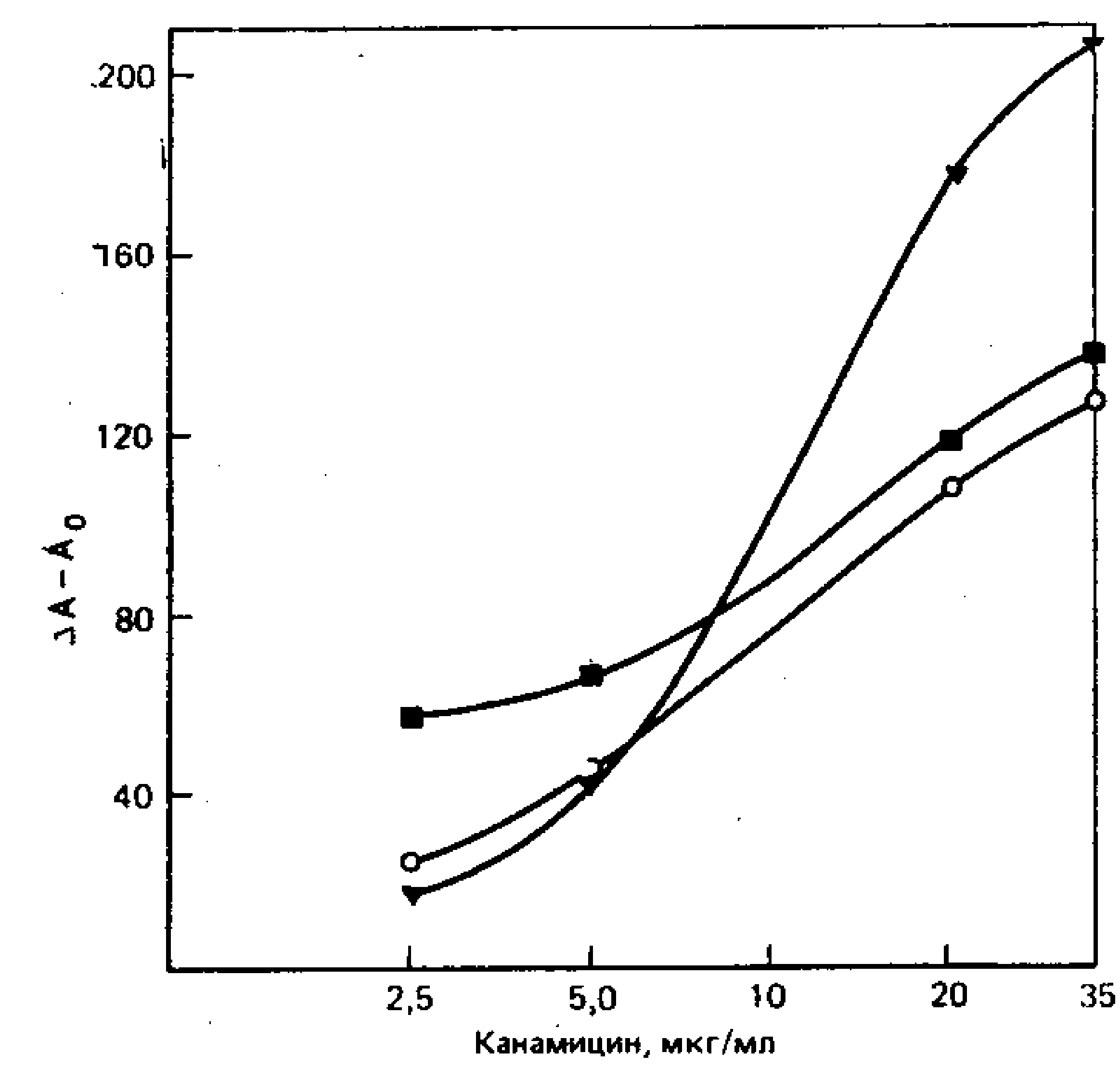


Рис. 3-10. Калибровочные кривые для анализа канамицина. Светлые кружки — конъюгат [амикацин — фермент] и антитела против амикацина. Темные квадраты — конъюгат [тобрамицин — фермент] и антитела против тобрамицина. Темные треугольники — конъюгат [канамицин — фермент] и антитела против тобрамицина.

длине боковых цепей гаптена в ферментном конъюгате и иммуногенном производном.

На рис. 3-11 показано влияние концентрации антител на аналитический сигнал при определении канамицина с помощью конъюгата [канамицин — фермент] и антител против тобрамицина. Поскольку кривые, соответствующие разным концентрациям лекарственного препарата, имеют неодинаковую форму, приходится выбирать компромиссную чувствительность, приемлемую как для низких, так и для высоких концентраций канамицина. Оптимальная дозировка для этой методики составляет 6 мкл раствора антител на образец.

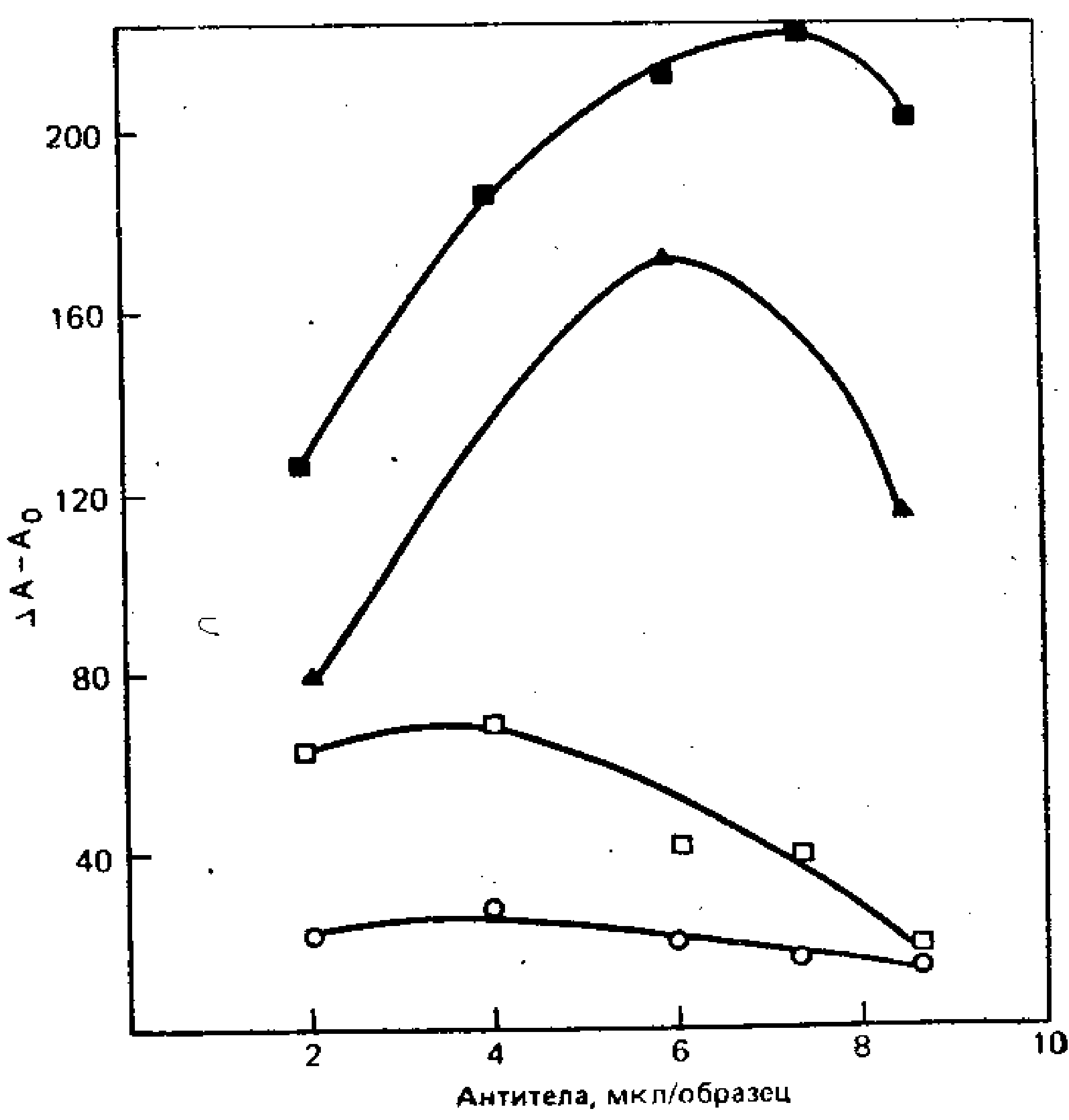


Рис. 3-11. Влияние концентрации антител против канамицина на аналитический сигнал. Зависимость сигнала от титра антител изучали при концентрации канамицина 2,5 мкг/мл (светлые кружки), 5 мкг/мл (светлые квадраты), 20 мкг/мл (темные треугольники) и 35 мкг/мл (темные квадраты). Использовали конъюгат [канамицин — фермент] и антисыворотку против тобрамицина.

Характеристики анализа

Характеристики EMIT[R]-анализа аминогликозидов подробно описаны в литературе. Опубликованы работы, посвященные определению гентамицина (Matzke et al., 1982; Ratcliff et al., 1981), тобрамицина (Woo et al., 1982), амикацина (Fukuchi et al., 1984). Разброс данных для одной и для разных серий опытов обычно <10% и часто бывает <5%. Коэффициент корреляции >0,9.

Стабильность реагентов

На стабильность реагентов влияют многие факторы, включая качество воды, используемой для получения растворов; условия хранения; состояние принадлежностей для измерения объемов и разбавления реагентов. В некоторых работах (Bach, Larsen, 1980; Gorsky, 1983; Gorsky et al., 1983) сообщается, что одной и той же калибровочной кривой можно пользоваться до 16 дней, если заново измерять сигнал, соответствующий отрицательному стандартному образцу, и вычитать его из других сигналов. Таким образом, калибровку можно производить реже. Для повышения устойчивости реагентов их поставляют в лиофилизованном состоянии. Сохранность свежих реагентов гарантируется по крайней мере в течение 12 нед.

Таблица 3-5. Стабильность количественного определения стандартных образцов хинидина и гентамицина (Qst)

День		Хинидин, мкг/мл	Гентамицин, мкг/мл
Хинидин	Генатамицин	3,0	6,0
1	1	3,0	5,7
8	8	2,9	6,0
15	15	3,1	6,4
22	22	2,9	6,6
36	36	2,9	6,1
56	55	2,8	5,8
73	66	3,3	5,9
92	79	3,3	5,9
101	108	3,2	5,9
134	133	3,1	5,9
141	141	3,1	—
Всего n[1)]		28	25
Среднее значение		3,1	6,2
Стандартное отклонение		0,28	0,31
Коэффициент вариации, %		7,4	4,9

[1)] С учетом повторных измерений, выполненных в один и тот же день.

При использовании разовых порций (Qst) для анализа гентамицина и хинидина перекалибровку можно выполнять раз в месяц или реже (табл. 3-5).

Обработка данных

На протяжении многих лет создавались схемы обработки данных, обеспечивающие точную калибровку и ее проверку (Wellington, 1981). Эти операции упрощаются при использовании ряда методов, разработанных для программируемого микрокомпьютера HP 85. В табл. 3-6 указаны особенности каждого метода. Система «Hewlett — Packard» позволяет легко изменять набор программ установкой другой ленты. Большими преимуществами обладает новая схема калибровки, требующая лишь двукратных измерений стандартных растворов № 1 и № 5,

Таблица 3-6. Системы обработки данных, предназначенные для анализов Syva

Система	Компьютер	Особенности системы
CP-5000	CP-5000	Результаты определения стандартных растворов (отрицательного раствора и растворов 1, 2, 3, 4, 5) сравниваются с калибровочной кривой, полученной с помощью коэффициентов (линейный анализ по методу наименьших квадратов). Если стандартные растворы укладываются в пределы допустимых отклонений, кривая рассчитывается с помощью нелинейного регрессионного анализа по методу наименьших квадратов. Таким образом, форма кривой определяется непосредственно из опытных данных
CP-5000 PLUS	CP-5000	Если коэффициенты неизвестны, проводится нелинейный анализ по методу наименьших квадратов. При использовании коэффициентов осуществляется линейный регрессионный анализ. Переход к нелинейному анализу в этом случае исключен. Пользователь может выбрать сокращенную схему калибровки (1, 1, 5, 5)
LP-6000	HP 85A	Предоставляет те же возможности по обработке данных, что и система CP-5000 PLUS. Кроме того, пользователь может задавать допустимые пределы для отклонений стандартных растворов и для нестабильности калибровочной кривой. Новая кривая строится только в том случае, когда одно или несколько контрольных измерений выходит за установленные пределы
LP-6500	HP 85B	Благодаря добавлению электронного диска возрастает скорость обработки данных. Расширенная память позволяет записывать результаты всех анализов, выполненных с помощью Г6ФДГ, на одной ленте

которые содержат определяемое вещество в наименьшей и наибольшей концентрациях. По найденным четырем точкам строят калибровочную кривую. При этом используют коэффициенты, вычисленные в Исследовательском институте Syva и описывающие ее форму. Результаты анализа совпадают с результатами, полученными при двукратном измерении всех калибровочных растворов. Благодаря заданию формы кривой калибровка упрощается и становится более точной.

Анализ больших партий образцов

Чтобы добиться чувствительности, требуемой для измерения низких концентраций, приходится увеличивать продолжительность инкубации образцов с антителами и затем с ферментным конъюгатом. При этом раздельный анализ большого числа образцов становится неудобным. Поэтому были разработаны методы для определения дигоксина, кортизола и тироксина в больших партиях образцов. При анализе дигоксина в качестве метки используют Г6ФДГ, а при анализе тироксина — МДГ (Jaklitsch et al., 1976). Обычно для этих анализов готовят разбавленный рабочий раствор антител; образцы предварительно обрабатывают, вызывая денатурацию белков, чтобы лекарственный препарат (гормон) мог конкурировать с ферментным конъюгатом за связывание с антителами; поглощение измеряют через 30 мин. Реагенты добавляют с помощью устройства для разбавления или раздаточного устройства, а оптическую плотность регистрируют вручную. Опубликована по крайней мере одна методика для автоматического определения дигоксина и тироксина на приборе «Cobas» (Oellerich et al., 1982).

Альтернативные методы

Кроме различных вариантов анализа с использованием в качестве метки фермента описано несколько альтернативных гомогенных методов. Гаптены можно конъюгировать с коферментом NAD (Carrico et al., 1976). Анализ с применением таких конъюгатов чувствителен к помехам со стороны биологических образцов. Разработан метод анализа, в котором NAD вводят в реакцию с карбодиимидным производным гентамицина (Cox, Buret, 1982). Конъюгат гентамицина, связанный с антителами, не может участвовать в циклической реакции с 6-фосфоглюконатом, катализируемой 6-фосфоглюконатдегидрогеназой. Образование NADPH растет с увеличением концентрации гентамицина в образце. Анализ требует двухчасовой инкубации при 30 °C с последующим выдерживанием в кипящей водяной бане в течение 3 мин для остановки реакции. Прежде чем измерить поглощение, инкубируют еще 30 мин при 25 °C.

Нго и Ленхофф (Ngo, Lenhoff, 1980) описали иммуноанализ с применением модуляторов ферментов, основанный на изменении активности индикаторного фермента под действием конъюгата [определяемое вещество — модулятор]. Ферментативная активность зависит от распределения антител против определяемого лиганда между свободным лигандом и конъюгатом. Принцип метода был продемонстрирован на примере определения 2,4-динитрофениллизина (ДНФ—Lys). Модулятором служат антитела к ферменту. 2,4-Динитрофторбензол вводят в реакцию с антителами к пероксидазе хрена ($Ат_{пх}$) и получают конъюгат ДНФ—$Ат_{пх}$). Антитела против ДНФ ослабляют ингибирующее действие этого конъюгата на ферментативную активность.

Описаны методы количественного автоматического анализа люминала, теофиллина, тобрамицина и гентамицина при помощи гомогенной иммунопреципитации (Wu et al., 1982, 1983). В этих методах лекарственный препарат, содержащийся в образцах, конкурирует с конъюгатом [лекарственный препарат—альбумин] за связывание с антителами. Количество осажденного комплекса [лекарственный препарат — альбумин — антитела] можно измерить после инкубации в течение 3 мин.

Перспективы метода

Благодаря созданию более чувствительных вариантов анализа и автоматизации операций, необходимых для измерения низких концентраций веществ в биологических жидкостях, происходит переход от трудоемких методик анализа больших партий образцов к более быстрым и удобным методикам.

Несомненно, будущее метода связано с выполнением гомогенного иммуноферментного анализа на новых автоматических анализаторах. Спрос клинических лабораторий на современную автоматику, вероятно, возрастет, так как курс на уменьшение расходов заставляет сокращать численность персонала. С этим же связан и переход от массового тестирования к анализу отдельных образцов, выбранных из большого набора. Приборы, пригодные для осуществления принципа «произвольных выборок», уже теперь доступны для клинических лабораторий.

Стоимость стандартизации можно снизить путем уменьшения либо числа калибровочных растворов, либо частоты перекалибровки. Возможные подходы к достижению этой цели могут заключаться в повышении устойчивости реагентов и (или) в разработке математических моделей для предсказания формы калибровочной кривой или для ее спрямления.

Краткое содержание

Рассмотрен гомогенный иммуноферментный анализ гаптенов без разделения компонентов, причем особое внимание уделено определению аминогликозидов. Описаны альтернативные методы, высказаны предположения о перспективах развития анализа.

Благодарности

Автор выражает признательность Тери Соарес и Карен Локман за помощь в подготовке рукописи.

Литература

Bach P. R., Larsen J. W. (1980). Stability of standard curves prepared for EMIT homogeneous enzyme immunoassay kits stored at room temperature after reconstitution, Clin. Chem., **26**, 652—654.

Carrico R. J., Christner J. E., Boguslaski R. C., Yeung K. K. (1976). A method for monitoring specific binding reactions with cofactor labeled ligands, Anal. Biochem., **72**, 271—282.

Centofanti J., Monte A., Grandsaert D., Chung B., Ruggieri M., Schneider R., Kabakoff D. (1981). The EMIT^{R}-st^{TM} drug detection system, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., **19**, 631.

Chang J., Gotcher S., Gushaw J. B. (1982). Homogeneous enzyme immunoassay for theophylline in serum and plasma, Clin. Chem., **28**, 361—367.

Cox C., Buret J. (1982). Spectrophotometric homogeneous immunoassay of serum gentamicin with oxidized nicotinamide adenine dinucleotide as label, Anal. Chem., **54**, 1862—1865.

Deleide V., Dona V., Malvano R. (1979). Homogeneous enzyme-immunoassay for anticonvulsant drugs: Effects of hapten-enzyme bridge length, Clin. Chem. Acta, **99**, 195—201.

Dols J. L., van Zanten A. P. (1981). Gentamicin assay: comparison of an adapted EMIT method and an RIA method, Ann. Clin. Biochem., **18**, 236—239.

Fukuchi H., Yoshida M., Tsukiai S., Kitaura T., Konishi T. (1984). Comparison of enzyme immunoassay, radioimmunoassay, and microbiologic assay for amikacin in plasma, Am. J. Hosp. Pharm., **41**, 690—693.

Gibbons I., Skold C., Rowley G. L., Ullman E. F. (1980). Homogeneous enzyme immunoassay for proteins employing β-galactosidase, Anal. Biochem., **102**, 167.

Gorsky J. E., Bach P. R., Wong W. (1983). Improved sensitivity of aminoglycoside enzyme immunoassays, Clin. Chem., **29**, 1994—1995.

Gorsky J. E. (1983). EMIT assay curve stability, Clin. Chem., **29**, 1690.

Hamlin C. R., Sullivan P. A. (1984). Adaptation of EMIT reagents to the Cobas Bio centrifugal analyser, Clin. Chem., **30**, 314—315.

Josefsohn M., Boeckx R. L., Hicks J. M. (1981). Adaptation of the EMIT gentamicin and tobramycin procedure to the IL microcentrifugal analyzer, Ther. Drug Mon., **3**, 365—370.

Jaklitsch A. P., Schneider R. S., Johannes R. J., Lavine J. E., Rosenberg G. L. (1976). Homogeneous enzyme immunoassay for T4 in serum, Clin. Chem., **22**, 1185.

Jaklitsch A. P., Gagne C. B., Kabakoff D. S., Leung D. K., Singh P., Protzmann W., 1980. Measurement of sisomicin concentration in fermentation broths by homogeneous enzyme immunoassay, Am. Chem. Soc., Meeting MBT, 23, Las Vegas, Nev., American Chemical Society.

Krogsted D. J., Granich G. G., Murray P. R., Pfaller M. A., Valdes R. (1982). Heparin interferes with the radioenzymatic and homogeneous enzyme immunoassays for aminoglycosides, Clin. Chem., **28**, 1517—1521.

Lockwood W. R., Bower J. D. (1973). Tobramycin and gentamicin concentrations

in the serum of anephric patients, Antimicrob. Agents Chemother., 3, 125—129.
Matzke G. R., Gwizdala C., Wery J., Ferry D., Starnes R. (1982). Evaluation of three gentamicin serum assay techniques, Ther. Drug Mon., 4, 195—200.
Matzke G. R., Piveral R., Halstenson C. E., Abraham P. A. (1984). Heparin interferes with the tobramycin serum concentration determinations by EMIT, Drug Intell. Clin. Pharm., **18**, 517—519.
Ngo T. T., Lenhoff H. M. (1980). Enzyme modulators as tools for the development of homogeneous enzyme immunoassays, FEBS Lett., **116**, 285—288.
Oellerich M., Haeckel R., Haindl H. (1982). Evaluation of EMIT adapted to the (Cobas) Bio centrifugal analyzer, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., **20**, 765—772.
Ou C. N., Frawley V. L., Buffone G. J. (1981). Optimization of EMIT reagent system using a Cobas-Bio centrifugal analyser, J. Anal. Toxicol., 5, 249—252.
Ratcliff R. M., Mirelli C., Moran E., O'Leary D., White R. (1981). Comparison of five methods for the assay of serum gentamicin, Antimicrob. Agents Chemother., **19**, 508—512.
Rowley G. L., Rubenstein K. E., Weber S. T., Ullman E. F., 1976. Mechanism by which antibodies inhibit hapten-glucose-6-phosphate dehydrogenase, Am. Chem. Soc. Meeting BIOL, 151, Washington, D. C., American Chemical Society.
Rubenstein K. E., Schneider R. S., Ullman E. F. (1972). «Homogeneous» enzyme immunoassay. A new immunochemical technique, Biochem. Biophys. Res. Commun., **47**, 846—851.
Singh P. S., Leung D. K., Rowley G. L., Gagne C., Ullman E. F. (1980). A method for controlled coupling of amino compounds to enzymes: a homogeneous enzyme immunoassay for gentamicin, Anal. Biochem., **104**, 51—58.
Tindula R. J., Ambrose P. J., Harralson A. F. (1983). Aminoglycoside inactivation by penicillins and cephalosporins and its impact on drug-level monitoring, Drug Intell. Clin. Pharm., **17**, 906—908.
Ullman E. F., Yoshida R. A., Blakemore J. I., Eimsted W., Ernst R., Leute R., Leung D. K., Maggio E. T., Ronald R., Sheldon B. (1979). Mechanism of inhibition of malate dehydrogenase by thyroxine derivatives and reactivation by antibodies. Basis for a homogeneous enzyme immunoassay for thyroxine, Biochim. Biophys. Acta, **567**, 66—74.
Wellington D., 1980. Mathematical treatments for the analysis of enzyme-immunoassay data. In: Enzyme-Immunoassay (E. T. Maggio, ed.), CRC Press, Boca Raton, Fla.
Whiting B., Kelman A. W., Bryson S. M., Derkx F. H. M., Thomson A. H., Fotheringham G. H., Joel S. E. (1984). Clinical Pharmacokinetics: a comprehensive system for therapeutic drug monitoring and prescsribing, Br. Med. J., **288**, 541—545.
Witebsky F. G., Sliva C. A., Selepak S. T., Buddel M. E., MacLowry J. D., Johnason E. E., Elin R. J. (1983). Evaluation of four gentamicin and tobramycin assay prosedures for clinical laboratories, J. Clin. Microbiol., **18**, 890—894.
Woo J., Longley M. A., Cannon D. C. (1982). Homogeneous enzyme immunoassay for tobramycin evaluated and compared with a radioimmunoassay, Clin. Chem., **28**, 1370—1374.
Wu J. W., Bunyagidj C., Hoskin S., Riebe S. M., Aucker J., White K., O'Neill S. P. (1983). Quantitation of haptens by homogeneous immunoprecipitation. 2. Centrifugal analysis for tobramycin, phenobarbital, and theophylline in serum, Clin. Chem., **29**, 1540—1542.
Wu J. W., Hoskin S., Riebe S. M., Gifford J. E., O'Neil S. P. (1982). Quantitation of haptens by homogeneous immunoprecipitation. 1. Automated analysis of gentamicin in serum, Clin. Chem., **28**, 659—661.

Глава 4

Модуляторы ферментов как метки для иммуноанализа без разделения компонентов: иммуноанализ с помощью модуляторов ферментов

Т. Т. Нго

Введение

Иммуноанализ с помощью модуляторов ферментов (ИФАМ) представляет собой метод без разделения компонентов, связанный с ферментативным усилением сигналов. В этом методе в качестве метки для определяемого лиганда (Л) используют модулятор фермента (М). Прочный ковалентный конъюгат [модулятор — лиганд; (М—Л)] способен изменять активность индикаторного фермента, т. е. действовать как мощный ингибитор или активатор.

Являясь аналогом лиганда, М—Л может эффективно конкурировать с ним за ограниченное число антител к Л. Однако при связывании с антителами М—Л утрачивает модулирующую активность. В условиях анализа соотношение между связанным с антителами и свободным, несвязанным конъюгатом М—Л зависит от концентрации Л. Свободный М—Л функционален, т. е. способен модулировать активность индикаторного фермента, тогда как связанный М—Л не функционален, т. е. не может модулировать ферментативную активность (Ngo, 1983).

Модуляторами ферментов называют вещества, способные влиять на каталитическую активность ферментов, т. е. подавлять ее или стимулировать. Модулятор изменяет ферментативную активность вследствие обратимых нековалентных или необратимых ковалентных взаимодействий. К обратимым нековалентным модуляторам относят оказывающие обратимый эффект ингибиторы ферментов (Webb, 1963), активаторы (Wong, 1975), аллостерические эффекторы (Stadtman, 1970), антитела против некоторых ферментов (Iwert et al., 1967; Cinader, 1976; Arnon, 1977), а также прочно связывающиеся ингибиторы и вещества, имитирующие переходное состояние (Wolfenden, 1969; Wolfenden, 1972; Leinhard, 1973; Ngo, Tunnicliff, 1981). Ковалентными необратимыми модуляторами являются необратимые ингибиторы, взаимодействующие с активным центром фермента (Baker, 1967; Shaw, 1980); необратимые ингибиторы, активируемые ферментами-«самоубийцами» и действующие по механизму снижения k_{cat} (Rando, 1974; Abeles, 1978); ферменты, катализирующие посттрансляционные модификации, например фосфорилирование или дефосфорилирование других ферментов (Krebs, 1972).

Принцип иммуноанализа с помощью модуляторов ферментов

Лиганд (Л) из анализируемого образца конкурирует с М—Л за постоянное и ограниченное число антител против Л (Ат) (рис. 4-1, реакции *I* и *II*). Как следует из рис. 4-1, при отсутствии Л реакция *I* не протекает, а М—Л и Ат соединяются по реакции *II*. Конъюгат М—Л, связанный с антителами (М—Л : Ат), не способен влиять на активность индикаторного фермента (Ф). Однако по мере увеличения концентрации определяемого вещества (Л) оно все более успешно конкурирует с М—Л за Ат (преобладает реакция *I*), при этом большее количество комплекса М—Л остается в свободном состоянии и он может взаимодействовать с индикаторным ферментом (см. рис. 4-1, реакция *III*), все сильнее изменяя его активность. Соответственно изменяется и количество субстрата (С), который превращается ферментом в продукт (П) за единицу времени (реакция *IV*). В зависимости от свойств модулятора ферментативная активность возрастает (когда модулятор обладает активирующим действием) или уменьшается (когда модулятором служит ингибитор). Таким образом, калибровочная кривая для ИФАМ на основе активатора фермента отражает увеличение ферментативной активности с ростом концентрации Л.

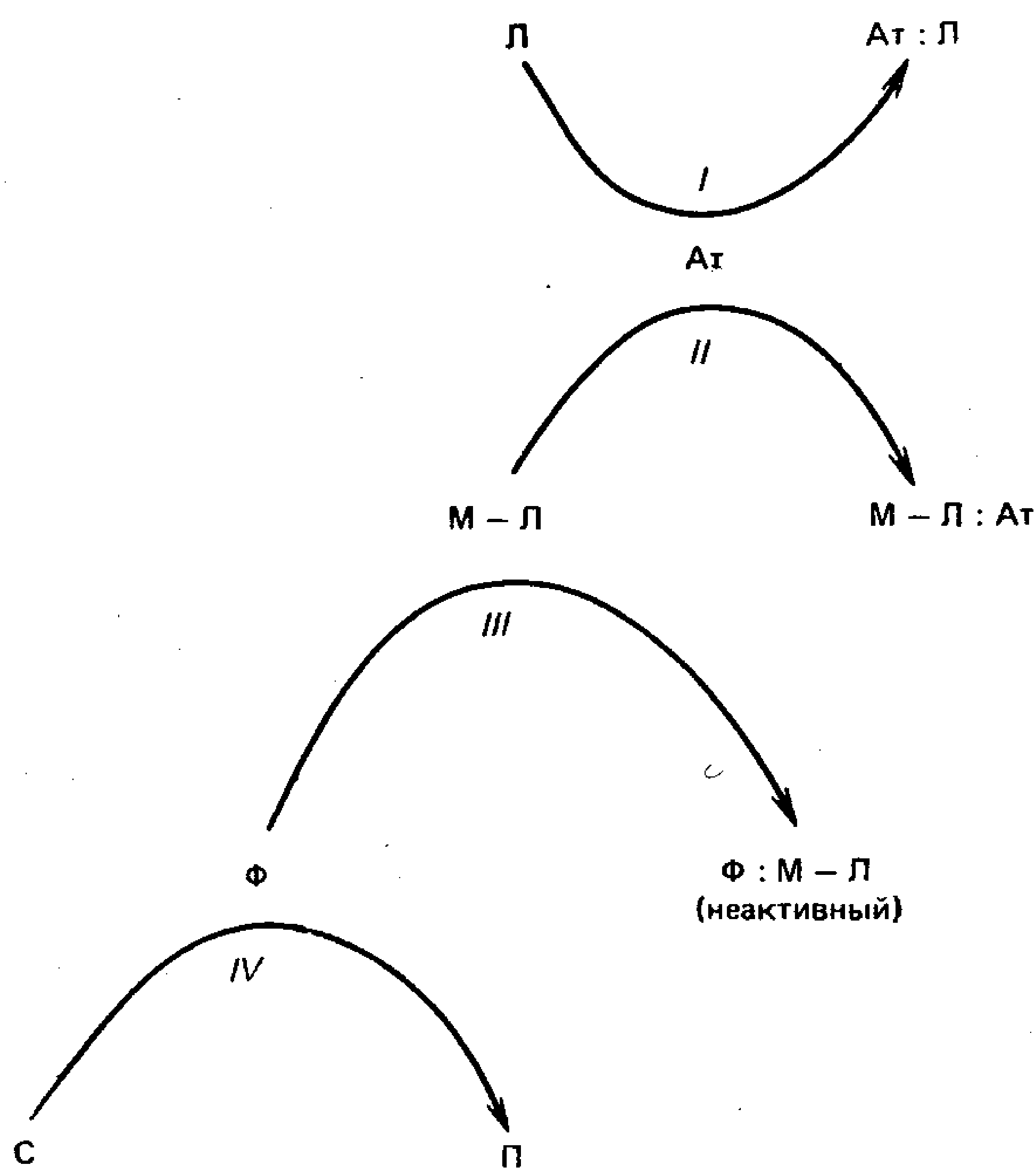


Рис. 4-1. Принцип иммуноанализа с помощью модуляторов ферментов (ИФАМ). Представлены схемы всех реакций, протекающих при выполнении анализа.

В случае ИФАМ на основе ингибитора фермента калибровочная кривая отражает понижение ферментативной активности с увеличением концентрации Л (Ngo, 1983).

Материалы и методы

Стратегия разработки ИФАМ

Разработка ИФАМ начинается с выбора подходящего фермента, который удовлетворяет следующим требованиям: 1) простота измерения ферментативной активности; 2) большое число оборотов, обеспечивающее значительное усиление сигнала; 3) дешевизна, доступность высокоочищенного фермента в больших количествах; 4) устойчивость в условиях проведения анализа и при хранении; 5) отсутствие аналогичной ферментативной активности в исследуемых образцах. Если в образцах присутствует фермент, подобный по специфичности индикаторному ферменту, то необходимо подобрать условия, в которых активность фермента из образцов не проявляется или может быть подавлена без воздействия на индикаторный фермент.

Следующий этап разработки ИФАМ состоит в выборе модулятора, имеющего необходимые свойства: 1) способность в малых концентрациях изменять активность индикаторного фермента (примерами таких модуляторов служат ингибиторы ферментов, отличающиеся высоким связывающим сродством, т. е. низкой K_i); 2) отсутствие подобной модулирующей активности в исследуемых образцах; 3) сохранение существенной модулирующей активности после ковалентного присоединения к лигандам; 4) утрата активности конъюгатом [модулятор — лиганд; (М—Л)] при связывании с антителами против Л; 5) в случае необратимых модуляторов реакция должна быть быстрой и специфичной по отношению к индикаторному ферменту, а ковалентный комплекс [фермент — модулятор] должен быть устойчивым в условиях анализа на протяжении всего опыта.

Установив, какую наименьшую концентрацию индикаторного фермента можно обнаружить, находят минимальную концентрацию модулятора, при которой ферментативная активность ингибируется по крайней мере на 80% (если в качестве модулятора применяют ингибитор). Для этого смешивают разные количества модулятора с одним и тем же количеством фермента (рис. 4-2, *А*). В аналогичном опыте определяют оптимальную концентрацию конъюгата [модулятор — лиганд; (М—Л)]. Модулирующее действие М—Л на активность индикаторного фермента обычно выражено слабее, чем у исходного немодифицированного, т. е. не связанного с лигандом модулятора (рис. 4-2, *Б*). Далее необходимо получить ответ на другой важ-

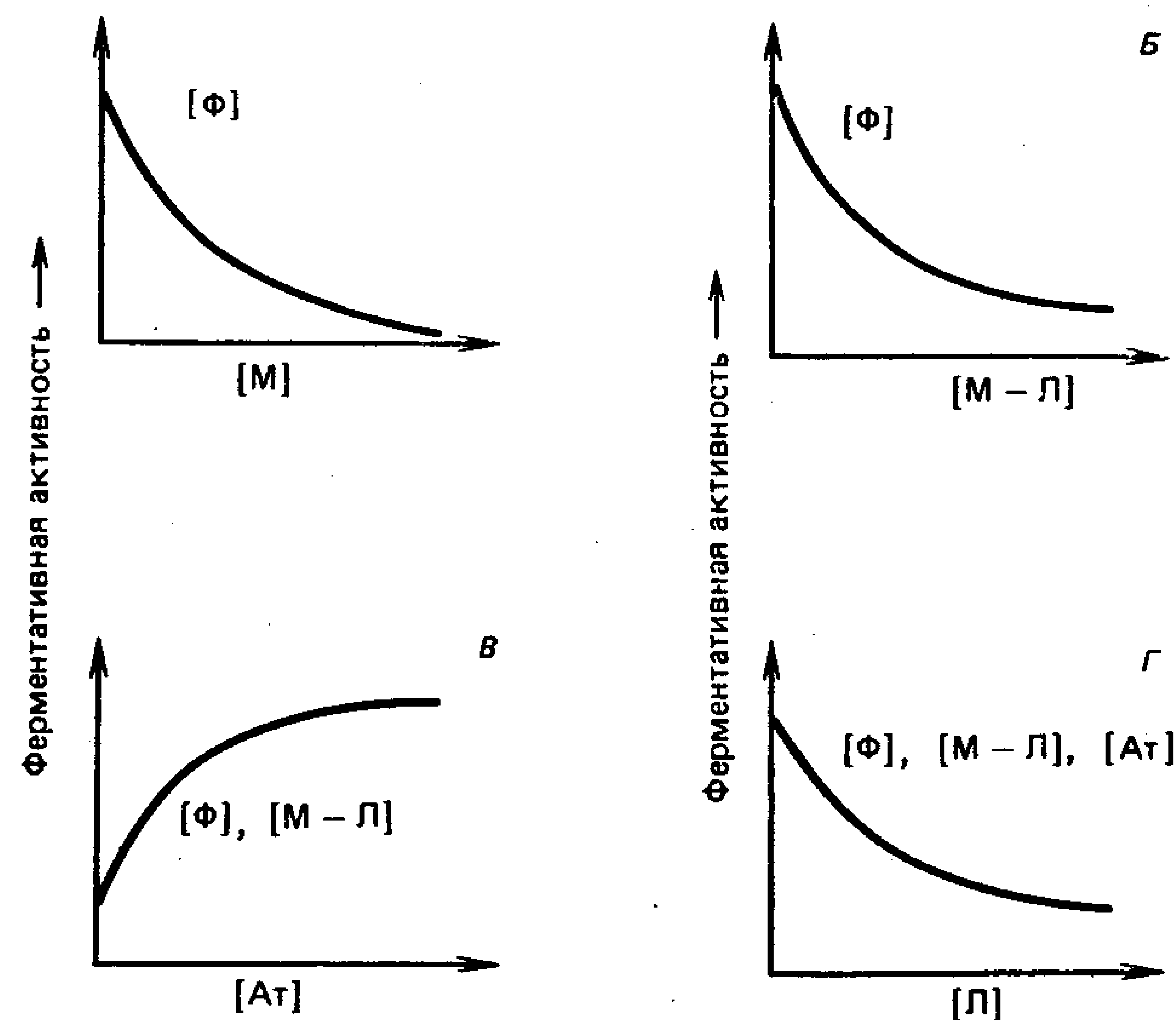


Рис. 4-2. Экспериментальные этапы разработки ИФАМ.

ный вопрос: может ли присоединение к М—Л специфических антител против Л устранить или существенно снизить модулирующую активность М—Л? Иными словами, может ли образование комплекса между М—Л и антителами, специфичными к Л, воспрепятствовать ингибированию активности индикаторного фермента? При постоянных концентрациях фермента и М—Л в отсутствие специфических антител к Л ферментативная активность должна быть минимальной; однако с увеличением концентрации антител активность индикаторного фермента должна пропорционально возрастать (рис. 4-2, *В*). Если такая зависимость показана, то построить калибровочную кривую будет сравнительно просто. Для этого нужно варьировать лишь одну величину — концентрацию лиганда, сохраняя постоянные концентрации фермента, М—Л и антител (рис. 4-2, *Г*).

Получение конъюгатов [модулятор — лиганд]

Как правило, лиганд присоединяют непосредственно к модулятору. До сих пор в качестве модуляторов были использованы только ингибиторы ферментов. В ИФАМ для модельного лиганда 2,4-динитрофениллизина Нго и Ленхофф соединили 2,4-динитрофторбензол с антителами против пероксидазы хрена ($Ат_{пх}$), игравшими роль модулятора (Ngo, Lenhoff, 1980). Образовавшийся 2,4-динитрофенилированный комплекс (ДНФ-$Ат_{пх}$) выполнял функции конъюгата М—Л, а индикаторным ферментом была пероксидаза хрена.

Описан ИФАМ с использованием в качестве модулятора необратимого ингибитора фермента (Finley et al., 1980; Blecka et al., 1983). Индикаторным ферментом служила ацетилхолинэстераза, а модулятором — фосфонатный ингибитор. Так, в ИФАМ для определения тироксина использовали ковалентный конъюгат [тироксин — фосфонатный ингибитор]. Недавно был разработан ИФАМ для теофиллина на основе его конъюгата с необратимым фосфонатным ингибитором ацетилхолинэстеразы (Blecka et al., 1983).

Для определения тироксина предложен и такой модулятор, как метотрексат — прочно связывающийся ингибитор дигидрофолатредуктазы (Place et al., 1983). Метотрексат через γ-карбоксильную группу глутамильного остатка ковалентно присоединяли к α-аминогруппе тироксина по методу смешанных ангидридов с использованием изобутилхлорформиата. Известен также ИФАМ для дифенилгидантоина (дилантина, противосудорожного средства) на основе связанного с ним авидина в роли конъюгата [модулятор — лиганд] и пируваткарбоксилазы в качестве индикаторного фермента (Bacquet, Twumasi, 1984). Для получения ковалентного конъюгата [авидин — дифенилгидантоин] в реакцию с авидином вводили N-гидроксисукцинимидный эфир дифенилгидантоинуксусной кислоты. Реакцию сочетания проводили в присутствии 4-гидроксиазобензол-2-карбоновой кислоты для защиты мест связывания авидина с биотином и предотвращения их взаимодействия с активированным лигандом. Еще один вариант ИФАМ для тироксина основан на применении в качестве модулятора комплементарного S-пептида рибонуклеазы (Gonnelli et al., 1981). S-Пептид получали ферментативным расщеплением нативной рибонуклеазы. В этом методе с одной цепью S-пептида ковалентно соединяются два остатка тироксина.

Результаты

При разработке методов ИФАМ были использованы три различных класса модуляторов: 1) высокомолекулярные (макромолекулярные) ингибиторы ферментов (Ngo, Lenhoff, 1980; Ngo, 1983; Bacquet, Twumasi, 1984); 2) низкомолекулярные необратимые ингибиторы ферментов (Finley et al., 1980; Blecka et al., 1983); 3) низкомолекулярные обратимые ингибиторы ферментов (Gonnelli ete al., 1981; Place et al., 1983). Ниже рассмотрены примеры ИМФ на основе каждого из этих классов модуляторов.

ИФАМ на основе макромолекулярных ингибиторов

Впервые метод ИФАМ на основе макромолекулярного ингибитора фермента разработали Нго и Ленхофф (Ngo, Lenhoff, 1980). В качестве специфического и мощного ингибитора пероксидазы хрена были использованы антитела против этого фермента. Многие антитела к ферментам действуют как очень сильные ингибиторы ферментативной активности (Cinader, 1976; Arnon, 1977). Использование специфических ингибирующих антител против ферментов в качестве модуляторов активности в ИФАМ дает ряд преимуществ: 1) поскольку ферменты представляют собой антигенные макромолекулы, антитела к ним обычно несложно получить путем инъекции животным раствора фермента; 2) высокоспецифичные моноклональные антитела против ферментов, обладающие сильным ингибирующим действием, можно получать с помощью гибридом (Kennett et al., 1980; Sevier et al., 1981); 3) аналоги определяемых лигандов, содержащие аминогруппы, карбоксильные или сульфгидрильные группы, можно непосредственно или с помощью сшивающих агентов присоединять к антителам через их карбоксильные, тирозильные, сульфгидрильные группы и аминогруппы; 4) ковалентное связывание аналогов лигандов с антителами не влияет сколько-нибудь существенно на иммунологические свойства антител или лигандов; 5) антитела устойчивы в обычных условиях проведения анализов; 6) легко доступны малые фрагменты антител, такие, как Fab или F(ab)$_2$.

В модельной системе ИФАМ, предложенной для измерения ДНФ-лизина, в качестве модулятора фермента используют антитела против пероксидазы, а в качестве индикаторного фер-

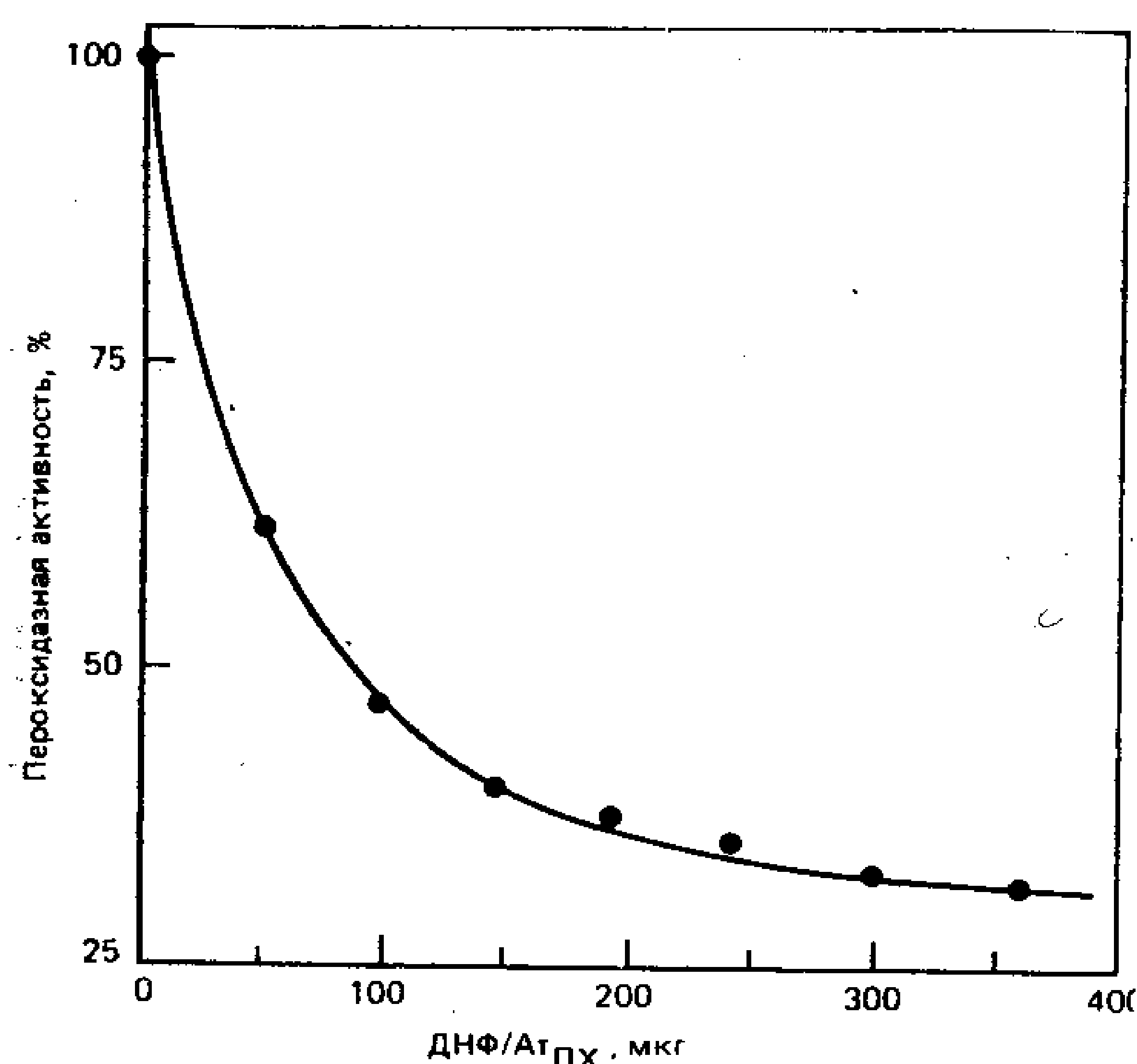


Рис. 4-3. Ингибирование пероксидазы хрена антителами против пероксидазы, меченными ДНФ (ДНФ—Ат$_{пх}$). Публикуется с разрешения издательства (Ngo, Lenhoff, 1980).

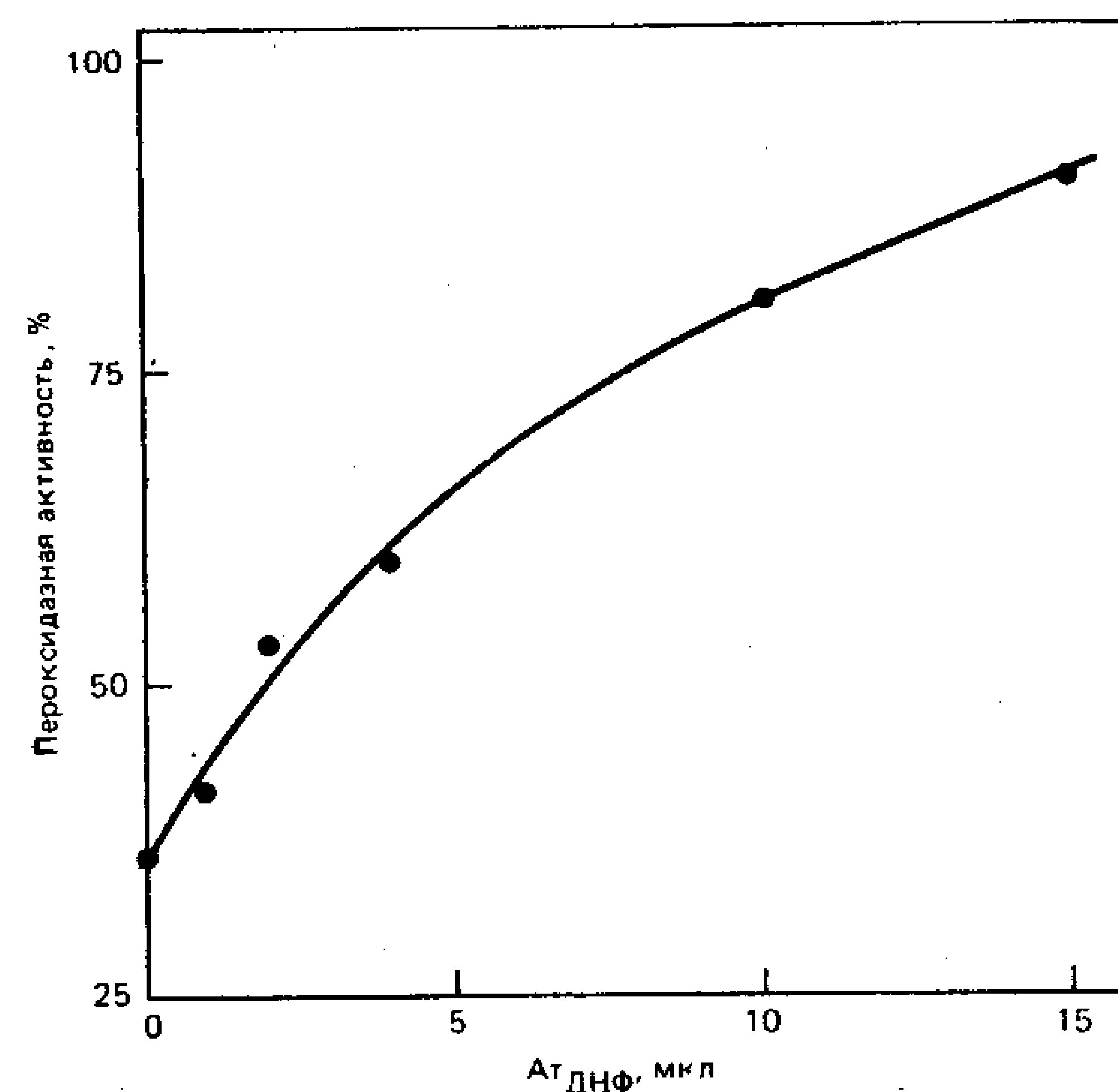


Рис. 4-4. Уменьшение ингибирующего действия конъюгата [ДНФ—Ат$_{пх}$] на пероксидазу хрена под влиянием антител к ДНФ (Ат$_{ДНФ}$). Публикуется с разрешения издательства (Ngo, Lenhoff, 1980).

мента пероксидазу хрена (Ngo, Lenhoff, 1980). Конъюгат [модулятор — лиганд], представляющий собой антитела против пероксидазы с ковалентно присоединенными ДНФ-группами (ДНФ—Ат$_{пх}$), сильно ингибирует пероксидазу хрена (рис. 4-3). Кроме того, показано, что антитела против ДНФ (Ат$_{ДНФ}$) способны устранять ингибирующее действие ДНФ—Ат$_{пх}$ на ферментативную активность. Как видно из рис. 4-4, при постоянных количествах пероксидазы хрена и ДНФ—Ат$_{пх}$ пероксидазная активность растет с увеличением содержания антител против ДНФ. Калибровочную кривую для ДНФ-лизина строили при постоянных концентрациях индикаторного фермента (пероксидазы хрена), антител против ДНФ (Ат$_{ДНФ}$) и антител против пероксидазы, связанных с ДНФ (ДНФ—Ат$_{пх}$). Микромолярные концентрации ДНФ-лизина определяли менее чем за 10 мин (рис. 4-5).

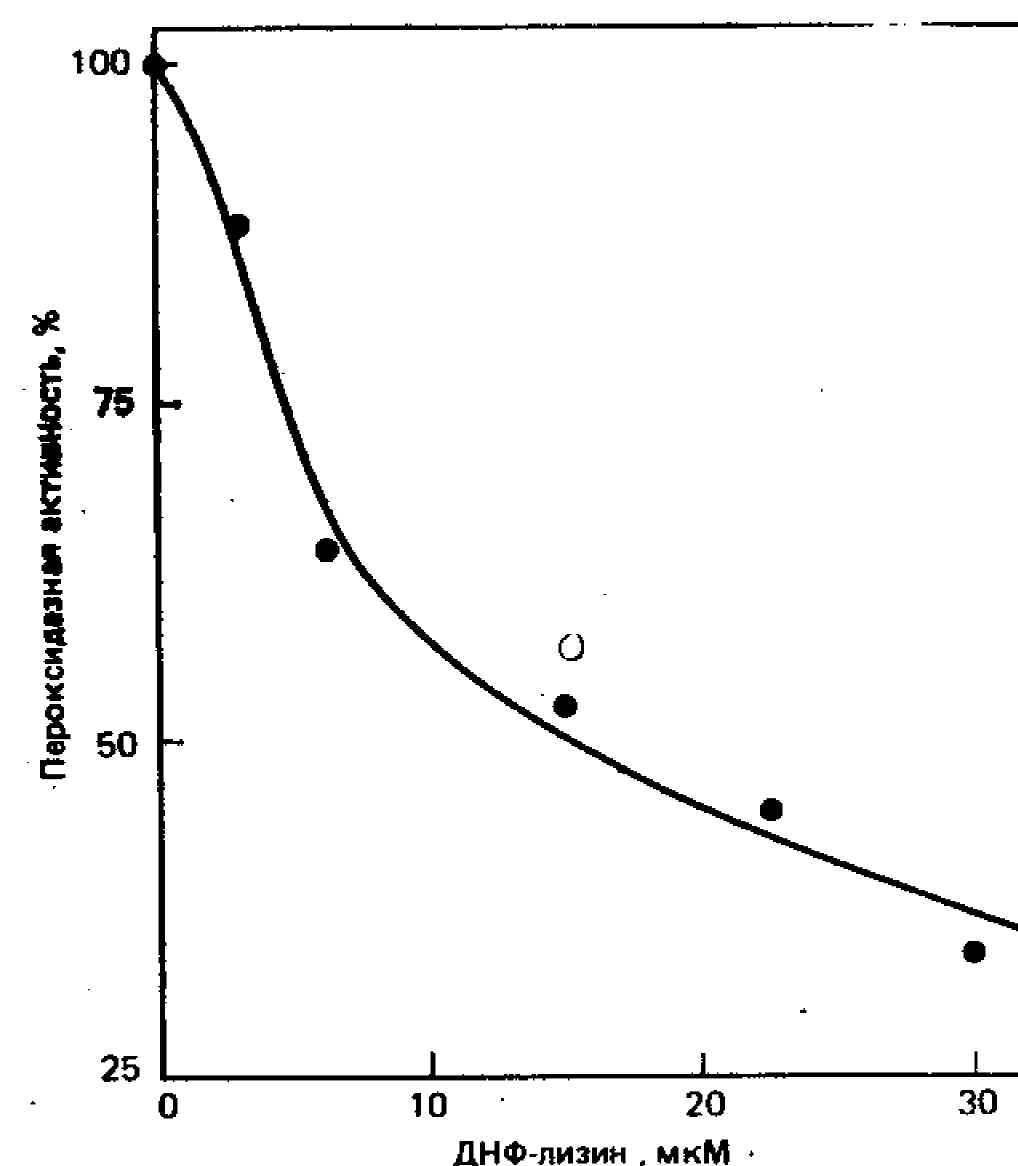


Рис. 4-5. Стандартная калибровочная кривая для определения ДНФ-лизина методом ИФАМ. Публикуется с разрешения издательства (Ngo, Lenhoff, 1980).

Авидин (мол. масса 66 000) — природный белок, прочно связывающийся с био-

тином, — обладает в целом теми же достоинствами, что и антитела. ИФАМ без разделения компонентов, основанный на использовании конъюгата авидина с 5-5-дифенилгидантоином (ДФГ) в качестве ингибирующего комплекса М—Л и пируваткарбоксилазы в качестве индикаторного фермента, разработан для определения 5,5-дифенилгидантоина (Bacquet, Twumasi, 1984). Конъюгат [авидин—ДФГ] и ДФГ из образца конкурируют за ограниченное число антител против ДФГ. Образование комплексов между антителами против ДФГ и конъюгатом [авидин—ДФГ] стерически или физически препятствует инактивации индикаторного фермента этим конъюгатом. При повышении концентрации ДФГ с антителами к нему связывается меньшая часть конъюгата [авидин—ДФГ], а это в свою очередь приводит к более сильной инактивации индикаторного фермента свободным конъюгатом [авидин—ДФГ].

ИФАМ на основе низкомолекулярного обратимого ингибитора

Разработан ИМФ на основе метотрексата (мол. масса 454,5), связанного с лигандом (Place et al., 1983). В качестве индикаторного фермента в этом методе используют дигидрофолатредуктазу (ДГФР). Метотрексат (МТ) представляет собой очень мощный обратимый ингибитор ДГФР. Наномолярные концентрации метотрексата ингибируют фермент на 50%. Для определения тироксина (T_4) методом ИФАМ применяют конъюгат этого вещества с МТ. Такой конъюгат получают ковалентным присоединением γ-карбоксильной группы глутамильного остатка метотрексата к α-аминогруппе T_4. Конъюгат МТ—T_4 тоже сильно ингибирует ДГФР. При концентрации 50 нМ он способен подавлять активность фермента на 80%. Однако инкубация с антителами против T_4 ослабляет ингибирующее действие МТ—T_4 и тем заметнее, чем выше концентрация антител. Добавление возрастающих количеств T_4 к растворам с постоянным содержанием МТ—T_4, ДГФР и антител против T_4 приводит к снижению ферментативной активности.

Высокое связывающее сродство МТ к ДГФР — привлекательная и очень полезная для ИФАМ особенность системы МТ—ДГФР. Тем не менее гидрофобная природа МТ, обусловленная птеридиновым и аминобензоильным кольцами, является серьезной помехой при использовании МТ в качестве модулятора в ИФАМ. Было отчетливо показано, что конъюгат МТ—T_4 неспецифически связывается с антителами к теофиллину, причем связывание достигает 50% (Place et al., 1983).

ИФАМ на основе низкомолекулярного необратимого ингибитора

Для определения тироксина (T_4) и теофиллина (Тео) методом ИФАМ в качестве модулятора было использовано фосфонатное производное — необратимый ингибитор ацетилхолинэстеразы (Finley et al., 1980; Blecka et al., 1983).

Конъюгаты [ингибитор — T_4] и [ингибитор — Тео] эффективно ингибируют ацетилхолинэстеразу, если они не соединены с антителами. Однако при связывании с соответствующими антителами, т. е. анти-T_4 и анти-Тео, эти конъюгаты утрачивают ингибирующие свойства, что позволяет ферменту гидролизовать субстрат — ацетил-β-(метилтио)холиниодид. Продукт ферментативного гидролиза — β-(метилтио)холин — реагирует с 5,5′-дитиобис(2-нитробензоатом) с образованием 5-тио-2-нитробензоата, окрашенного в интенсивный желтый цвет (λ_{max}=415 нм). Сывороточную псевдохолинэстеразу ингибировали добавлением к анализируемому раствору сульфата N-метилорфенандрина. Калибровочная кривая для T_4 охватывает интервал от 58 до 154 нМ, а для Тео — от 0 до 222 мкМ. Аналитическое обнаружение T_4 и Тео методом ИФАМ составляет около 100%. Анализ отличается высокой точностью: коэффициенты вариации <5% при сравнении разных серий опытов и <4% внутри одной серии. Предел обнаружения равен 2,56 нМ для T_4 и 2,22 мкМ для Тео.

ИФАМ на основе S-пептида и S-белка рибонуклеазы

Давно уже известно, что рибонуклеазу — фермент, состоящий из 124 аминокислотных остатков, — после ферментативного гидролиза можно разделить на два неактивных полипептида (Richards, Vithayathil, 1959). Меньший пептид, содержащий 20 аминокислотных остатков, называют S-пептидом, а больший, построенный из 104 аминокислотных остатков, называют S-белком. Ни S-пептид, ни S-белок сами по себе не обнаруживают каталитической активности. Однако нековалентный комплекс S-пептида и S-белка в соотношении 1 : 1 обладает такой же активностью, как нерасщепленная рибонуклеаза. Через функциональные группы двух остатков лизина S-пептид удалось соединить с производными T_4 (Gonnelli et al., 1981). В отличие от нативного S-пептида, который способен полностью восстанавливать рибонуклеазную активность, S-пептид, связанный с T_4, обеспечивает лишь 40% максимальной активности фермента.

Тем не менее добавление антител против тироксина к раствору, содержащему конъюгат [T_4 — S-пептид] и S-белок, повышает рибонуклеазную активность почти до 90% полной ферментативной активности. Оказалось, что при связывании антител против T_4 с конъюгатом [T_4 — S-пептид] образуется комплекс с более благоприятным для катализа расположением аминокислотных остатков, обеспечивающих рибонуклеазную активность. Специфическое связывание антител с конъюгатом ингибируется свободным T_4.

При добавлении возрастающих количеств T_4 к растворам с постоянным содержанием S-белка, конъюгата [T_4 — S-пептид] и антител к T_4 рибонуклеазная активность уменьшается. Построив калибровочную кривую, можно определять неизвестные концентрации T_4.

Обсуждение

Показано, что модуляторы ферментов могут служить универсальными метками для иммуноферментного анализа без разделения компонентов (т. е. для гомогенного анализа). Предъявляемым требованиям лучше всего удовлетворяют модуляторы, легко образующие прочные конъюгаты с лигандами и обладающие высоким связывающим сродством к индикаторному ферменту. Для повышения чувствительности ИФА нужно использовать конъюгаты [модулятор — лиганд], проявляющие к индикаторному ферменту максимальное сродство.

При разработке методов иммуноферментного анализа можно использовать несколько классов модуляторов ферментов. Например:

1. Макромолекулярные ингибиторы, в частности авидин — гликопротеин, выделенный из яичного белка. Авидин состоит из четырех одинаковых субъединиц и имеет мол. массу 66 000. Одна молекула авидина соединяется с четырьмя молекулами биотина. Константа связывания биотин — авидин необычайно высока, она составляет 10^{15} M^{-1} (Green, 1975). Авидин способен инактивировать некоторые биотинзависимые ферменты. Это открывает большие возможности для его применения в качестве модулятора в ИФАМ. Описан метод ИФАМ для определения противосудорожного лекарственного препарата 5,5-дифенилгидантоина, основанный на использовании его конъюгата с авидином (Bacquet, Twumasi, 1984). Нго и Ленхофф разработали ИФАМ, в котором макромолекулярным ингибитором служат антитела против фермента (Ngo, Lenhoff, 1980). К преимуществам использования антител в качестве модуляторов ферментов в ИФАМ относятся высокое взаимное сродство фермента (антигена) и антифермента (антител), а также возможность вызывать иммунный ответ и получать ингибирующие антитела против целого ряда ферментов (Cinader, 1976; Arnon, 1977). Выделение таких антител упростилось после создания метода гибридом (Kohler, Milstein, 1975), позволяющего вырабатывать моноклональные антитела в больших количествах (Sevier et al., 1981).

2. Низкомолекулярные обратимые ингибиторы ферментов, такие, как метотрексат — очень мощный ингибитор дигидрофолатредуктазы (Place et al., 1983). Хотя метотрексат связывается с дигидрофолатредуктазой очень прочно, целесообразность его применения для разработки ИФАМ сомнительна. Молекула метотрексата довольно гидрофобна, и поэтому она неспецифически связывается со многими макромолекулами, особенно белковыми. Другое осложнение в случае системы метотрексат — дигидрофолатредуктаза возникает из-за неустойчивости ферментного субстрата.

3. Хорошими модуляторами для ИФАМ оказались низкомолекулярные необратимые ингибиторы ферментов, например фосфонатный ингибитор ацетилхолинэстеразы. На основе конъюгатов этого ингибитора с T_4 и теофиллином удалось разработать методы ИФАМ для анализа T_4 и теофиллина. Эти методы обладают приемлемой точностью и чувствительностью (Finley et al., 1980; Blecka et al., 1983).

4. В роли модулятора в ИФАМ для определения T_4 был использован также S-пептид рибонуклеазы, образующий каталитически активный комплекс с S-белком (Gonnelli et al., 1981).

В качестве потенциальных модуляторов для ИФАМ можно рассматривать такие мощные и специфичные ингибиторы ферментов, как аналоги переходного состояния (Lienhard, 1973; Wolfenden, 1969, 1972), а также ингибиторы, специфичность которых связана с определенным механизмом действия ферментов, известные еще как k_{cat}-ингибиторы или ингибиторы ферментов-«самоубийц» (Rando, 1974; Abeles, 1978).

Можно предположить, что некоторые конъюгаты [модулятор — лиганд] удастся получить в больших количествах с помощью генно-инженерных методов. Например, для крупномасштабного производства конъюгата [модулятор—лиганд] можно методом рекомбинантных ДНК ввести в геном микроорганизма синтетический ген, кодирующий полипептидный гормон и S-пептид рибонуклеазы в виде единой полипептидной цепи.

Литература

Abeles R. H., 1978. Suicide enzyme inactivators, In: Enzyme-Activated Irreversible Inhibitors, N. Seiler, M. J. Jung and J. Koch-Weser, eds., Elsevier North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 1—12.

Arnon R., 1977. Immunochemistry of Lysozyme. In: Immunochemistry of Enzymes and Their Antibodies, M. R. J. Galton, ed., Wiley, New York, pp. 1—28.

Bacquet C., Twumasi D. Y. (1984). A homogeneous enzyme immunoassay with avidin-ligand conjugate as the enzyme modulator, Anal. Biochem., **136**, 487—490.

Baker B. R., 1967. Design of Active-Site-Directed Irreversible Enzyme Inhibitors, Wiley, New York.

Blecka L. J., Shaffar M., Dworschack R., 1983. Inhibitor enzyme immunoassays for quantitation of various haptens. In: Immunoenzymatic techniques, S. Avrameas, P. Druet, R. Masseyeff and G. Feldman, eds., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 207—214.

Cinader B., 1976. Enzyme-antibody interactions. In: Methods of Immunology and Immunochemistry, Chase M. and Williams C., eds., Academic Press, New York, pp. 313—375.

Finley P. R., Williams R. J., Lichti D. A. (1980). Evaluation of a new homoge-

neous enzyme inhibitor immunoassay of serum throxine with use of a bichromatic analyser, Clin. Chem., **26**, 1723—1726.
Gonnelli M., Gabellierti E., Montagnoli G., Felicioli R. (1981). Complementing S-peptide as modulator in enzyme immunoassay, Biochem. Biophys. Res. Commun., **103**, **917—923**.
Green N. M., 1975. Avidin. In: Advances in Protein Chemistry, C. B. Anfinsen, J. T. Edsall and F. M. Richards, eds., Academic Press, New York, pp. 85—133.
Iwert M. E., Nelson N. S., Rust J. H. (1967). Some immunologic properties of Jackbean urease and its antibody, Archs. Biochem. Biophys., **122**, 95—104.
Kennett R. H., McKearn J. J., Bechtol K. B., Eds., 1980. Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, New York.
Kohler G., Milstein C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature, **156**, 495—497.
Krebs E. G., 1972. Protein kinases. In: Current Topics in Cellular Regulation, B. L. Horecker and E. R. Stadtman, eds., Academic Press, New York, pp. 99—133.
Ngo T. T. (1983). Enzyme modulator mediated immunoassay (EMMIA), Int. J. Biochem., **15**, 583—590.
Ngo T. T., Lenhoff H. M. (1980). Enzyme modulators as tools for the development of homogeneous enzyme immunoassays, FEBS Lett., **116**, 285—288.
Ngo T. T., Lenhoff H. M. (1982). Enzymes as versatile labels and signal amplifiers for monitoring immunochemical reactions, Molec. Cell Biochem., **44**, 3—12.
Ngo T. T., Tunnicliff G. (1981). Inhibition of enzymic reactions by transation state analogs: An approach for drug design, Gen. Pharmac., **12**, 129—138.
Place M. A., Carrico R. J., Yeager F. M., Albarella J. P., Boguslaski R. C. (1983). A colorimetric immunoassay based on enzyme inhibitor method, J. Immunol. Method, **61**, 209—216.
Rando R. R., 1974. Chemistry and enzymology of k_{cat} inhibitors. — Science, v. 185, N 4148, p. 320—324.
Richards F. M., Vithayathil P. J. (1959). The preparation of subtilisin-modified ribonuclease and the separation of the peptide and protein components, J. Biol. Chem., **234**, 1459—1465.
Sevier D. E., David G. S., Martinis J., Desmond W. J., Bartholomew R. M., Wang R. (1981). Monoclonal antibodies in clinical immunology, Clin. Chem., **27**, 1979—1806.
Shaw E. N., 1980. Design of irreversible inhibitors. In: Enzyme Inhibitors as Drugs, M. Sandler, ed. University Park Press, Baltimore, pp. 24—42.
Stadtman E. R., 1970. Mechanisms of enzyme regulation in metabolism. In: The Enzymes, P. D. Boyer, ed., Academic Press, New York, Vol. 1, pp. 397—459.
Webb J. L., 1963. Enzyme and metabolic inhibitors, Academic Press, New York, Vols 1—3.
Wolfenden R. (1969). Transition state analogs for enzyme catalysis, Nature, **223**, 704—705.
Wolfenden R. (1972). Analog approaches to the structure of the transition state in enzyme reactions, Acc. Chem. Res., **5**, 10—18.
Wong J. T. F., 1975. Kinetics of Enzyme Mechanisms, Academic Press, New York, pp. 30—72.

Глава 5

Иммуноферментный анализ с применением в качестве метки простетических групп

Т. Т. Нго

Введение

Общие положения

Иммуноферментный анализ с применением в качестве метки простетических групп (ИФАПГ) представляет собой метод иммуноанализа без разделения компонентов (т. е. гомогенного анализа). Метод основан на: 1) способности прочного ковалентного конъюгата [лиганд—простетическая группа] активировать апофермент, который сам по себе не проявляет ферментативной активности; 2) способности антител против лиганда соединяться с конъюгатом [лиганд—простетическая группа], лишая его возможности активировать апофермент.

В ИФАПГ конъюгат [лиганд—простетическая группа] выполняет две самостоятельные функции. Во-первых, он служит аналогом простетической группы и может активировать апофермент. Во-вторых, он является аналогом лиганда и может конкурировать с лигандом за места связывания на соответствующих антителах.

При разработке ИФАПГ были использованы апоглюкозооксидаза и лиганд, меченный флавинадениндинуклеотидом (Л—FAD), так как апоглюкозооксидаза очень прочно связывает FAD с константой связывания 10^{10} M^{-1} (Okuda et al., 1979). Кроме того, в определенных условиях апоглюкозооксидазу можно стабилизировать, а для некоторых веществ можно получить ковалентные конъюгаты [лиганд—FAD].

Принцип ИФАПГ

Прочный ковалентный конъюгат [лиганд—простетическая группа фермента; (FAD—Л)] ведет себя как аналог лиганда, способный конкурировать с определяемым лигандом (Л) за специфические антитела (Ат) (рис. 5-1, реакция *II*). Образование комплекса FAD—Л : Ат по реакции *II* препятствует связыванию остатка FAD с апоглюкозооксидазой (АпоГО), вероятно, из-за возникающих пространственных затруднений. Свободный, т. е. не связанный с антителами конъюгат FAD—Л легко присоединяется к АпоГО по реакции *III*, формируя каталитически активную гологлюкозооксидазу (ГолоГО). FAD—Л служит эффективным заменителем простетической группы. В отсутствие

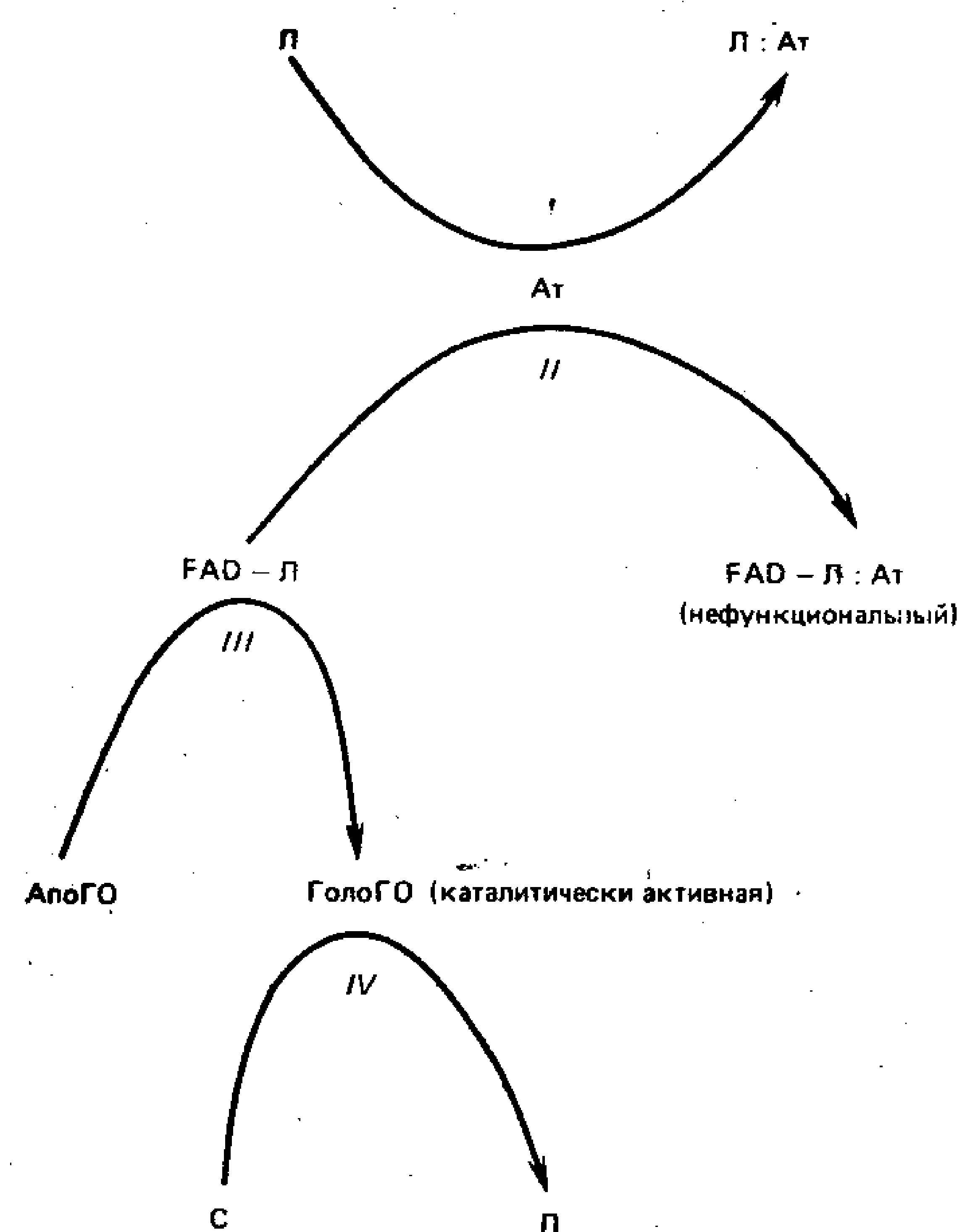


Рис. 5-1.

определяемого вещества Л реакция *I* не протекает: таким образом, антитела связываются с FAD—Л (реакция II) и лишают остаток FAD способности соединяться с АпоГО (реакция *III*). Напротив, по мере увеличения концентрации Л он все более успешно конкурирует за Ат (реакция *I*), при этом все бóльшая часть FAD—Л остается в свободном состоянии и может соединяться с АпоГО (реакция *III*). В результате возрастает количество гологлюкозооксидазы, катализирующей окисление глюкозы (С) в глюконовую кислоту (П) по реакции IV (Ngo, Lenhoff, 1982).

Получение апоглюкозооксидазы

Все описанные варианты получения апоглюкозооксидазы из голофермента включают стадию диссоциации в присутствии серной кислоты (Solomon, Levin, 1976; Massey, Mendelsohn, 1979; Ngo, Lenhoff, 1980a; Morris et al., 1981). В лучшем из этих вариантов (Ngo, Lenhoff, 1980a; Morris et al., 1981) раствор глюкозооксидазы в 30%-ном глицероле подкисляют при —5°C 10%-ной H_2SO_4 до pH $\simeq 1$. После отделения FAD от апоглюкозооксидазы с помощью геля для обессоливания апофермент нейтрализуют до pH 6,5 и перемешивают с порошком активированного угля для удаления оставшихся следов адсорбированного FAD. Наконец, удаляют уголь центрифугированием и фильтрованием раствора апофермента через фильтр «Millipore». Полученный раствор устойчив в течение нескольких месяцев при 4°C в присутствии антимикробных агентов, например 0,1%-ного NaN_3.

Получение конъюгатов FAD — Л

Общая стратегия синтеза конъюгатов FAD—Л предусматривает либо непосредственное связывание активированного аналога лиганда с аминогексильным производным FAD, либо

связывание активированного карбоксильного производного FAD с аминопроизводным лиганда, либо ковалентное присоединение лиганда к аминогексил-FAD с помощью бифункционального сшивающего агента (рис. 5-2).

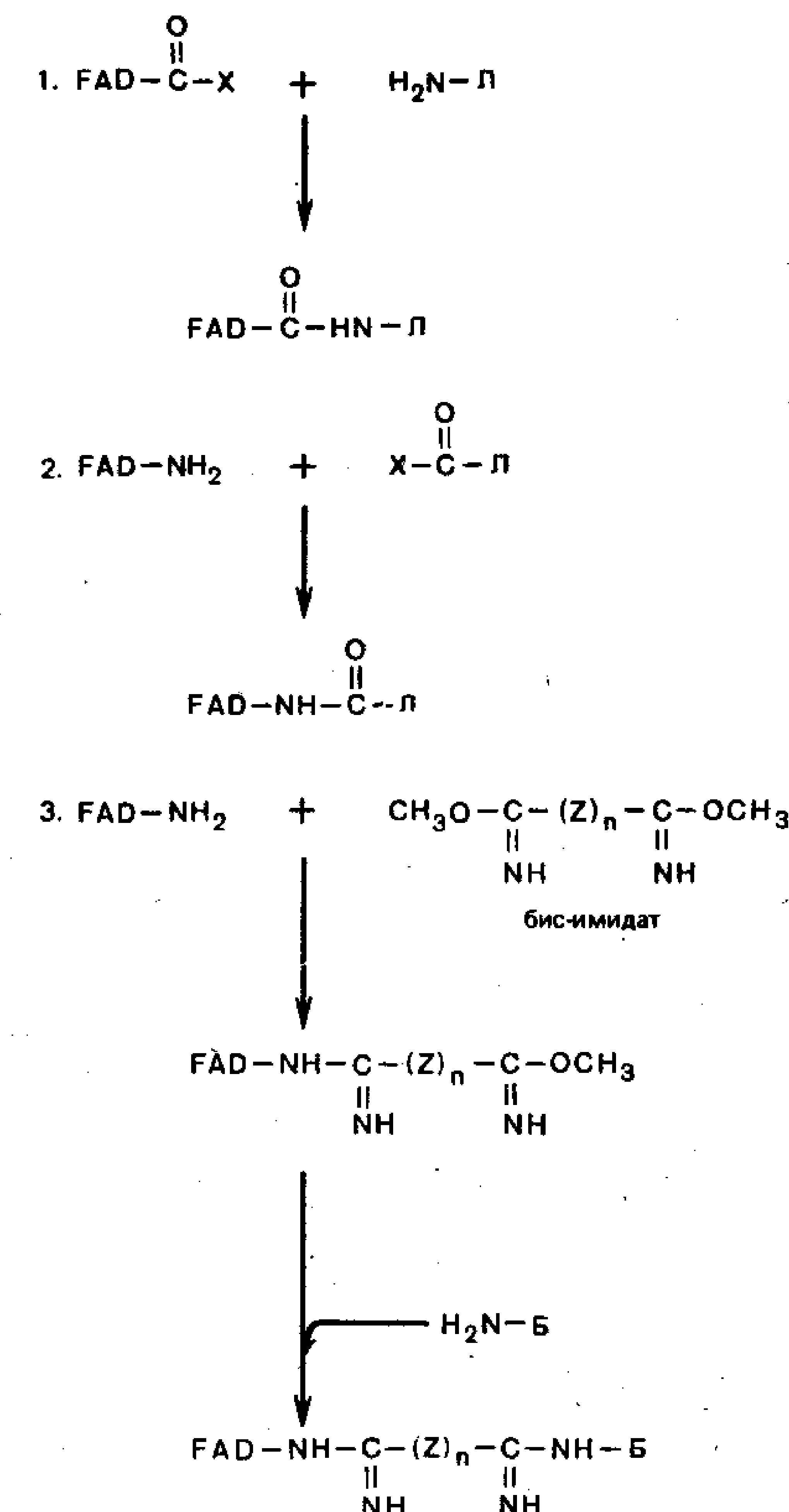


Рис. 5-2. Способы синтеза конъюгатов FAD—Л. *X* — активированная группа, например хлорид или эфир гидроксисукцинимида или *n*-нитрофенола; *Z* — метиленовая группа; Б — белок.

Синтез флавин-N^6-(6-аминогексил)адениндинуклеотида (аминогексил-FAD)

При активации N^6-(трифторацетамидогексил)аденозин-5′-монофосфата N,N′-карбонилдиимидазолом получают имидазолид, который затем соединяют с рибофлавин-5′-монофосфатом с образованием флавин-N^6-(трифторацетамидогексил)-адениндинуклеотида. Щелочной гидролиз этого продукта дает желаемый аминогексил-FAD (Morris et al., 1981).

Синтез FAD-теофиллина

Это вещество получают присоединением аминогексил-FAD к 8-(3-карбоксипропил)-1,3-диметилксантину — производному теофиллина (Cook et al., 1976).

Синтез конъюгата [FAD — иммуноглобулин G человека] (FAD — IgG)

Для получения этого конъюгата связывают аминогексил-FAD с IgG человека, используя в качестве сшивающего агента диметилсуберимидат. Как правило, сначала проводят реакцию между аминогексил-FAD и диметилсуберимидатом в стехиометрическом соотношении (буфер pH 8—9, 5—10 мин при комнатной температуре), а затем добавляют раствор IgG человека, pH 8—9. Применяемый буфер не должен содержать аминогрупп. Раствор непрерывно перемешивают при комнатной температуре 1—2 ч. После хроматографического обессоливания и диализа против фосфатно-солевого раствора конъюгат

FAD—IgG готов в употреблению. Раствор FAD—IgG в присутствии 0,1%-ного азида натрия можно хранить при 4 °C в течение нескольких месяцев (Ngo et al., 1981).

Измерение активности глюкозооксидазы

Глюкозооксидазу можно измерять колориметрически, вводя выделяющийся при ее действии пероксид водорода в сопряженные реакции, катализируемые пероксидазой хрена. Самым популярным хромогеном для реакции с H_2O_2 и пероксидазой была смесь аминоантипирина и 2-гидрокси-3,5-дихлорбензолсульфокислоты (Barham, Trinder, 1972). Однако новый пероксидазный метод на основе гидразона 3-метил-2-бензотиазолинона и 3-(диметиламино)бензойной кислоты (Ngo, Lenhoff, 1980b) «превосходит все другие колориметрические методы детектирования с помощью пероксидазы» (Geoghegan et al., 1983).

Результаты

Восстановление гологлюкозооксидазы из апоглюкозооксидазы и FAD — Л

На начальном этапе разработки ИФАПГ необходимо проверить, является ли конъюгат FAD—Л простетической группой для апофермента, т. е. для апоглюкозооксидазы. Как FAD—теофиллин, так и FAD—IgG оказались очень активными простетическими группами апоглюкозооксидазы. Однако в расчете на 1 моль их активность ниже по сравнению с FAD.

Ингибирующее влияние антител к Л на способность FAD — Л активировать апоглюкозооксидазу

На следующем этапе разработки ИФАПГ нужно показать, что антитела против лиганда мешают конъюгату FAD—Л активировать апоглюкозооксидазу. Оказалось, что антитела к теофиллину и к IgG человека специфически ингибируют соответственно FAD—теофиллин и FAD—IgG. При высоких концентрациях специфических антител ингибирование активности FAD—Л достигает 95%. Сыворотка неиммунизированных животных или животных, которых иммунизировали другими иммуногенами, не способна ингибировать образование гологлюкозооксидазы из апоглюкозооксидазы и FAD—Л. На рис. 5-3 показана типичная зависимость активности голофермента от концентрации антител.

Устранение ингибирующего влияния антител на способность FAD — Л активировать апоглюкозооксидазу: конкуренция Л и FAD — Л за антитела к Л

Еще одно условие, необходимое для успешной разработки ИФАПГ, заключается в способности определяемого лиганда (Л) ослаблять ингибирование антителами к Л процесса активации апоглюкозооксидазы под действием FAD—Л, т. е. процесса восстановления гологлюкозооксидазной активности. Если к ряду растворов с возрастающей концентрацией определяемого лиганда, такого, как IgG или теофиллин, добавить растворы с постоянным содержанием FAD—IgG или FAD—теофиллин, антител к IgG человека или к теофиллину и апоглюкозооксидазы, то увеличение активности гологлюкозооксидазы будет прямо пропорционально концентрации теофиллина или IgG человека (Morris et al., 1980, 1981). В большинстве случаев количество антител было достаточным для ингибирования 50—80% максимальной активности гологлюкозооксидазы, так что фоновое поглощение света было вполне приемлемым и в то же время при добавлении лиганда в низких концентрациях происходило эффективное ослабление ингибирования. Предложены две методики ИФАПГ: 1) лиганд (Л) и FAD—Л выдерживают одновременно с антителами к Л и апоглюкозооксидазой; 2) лиганд

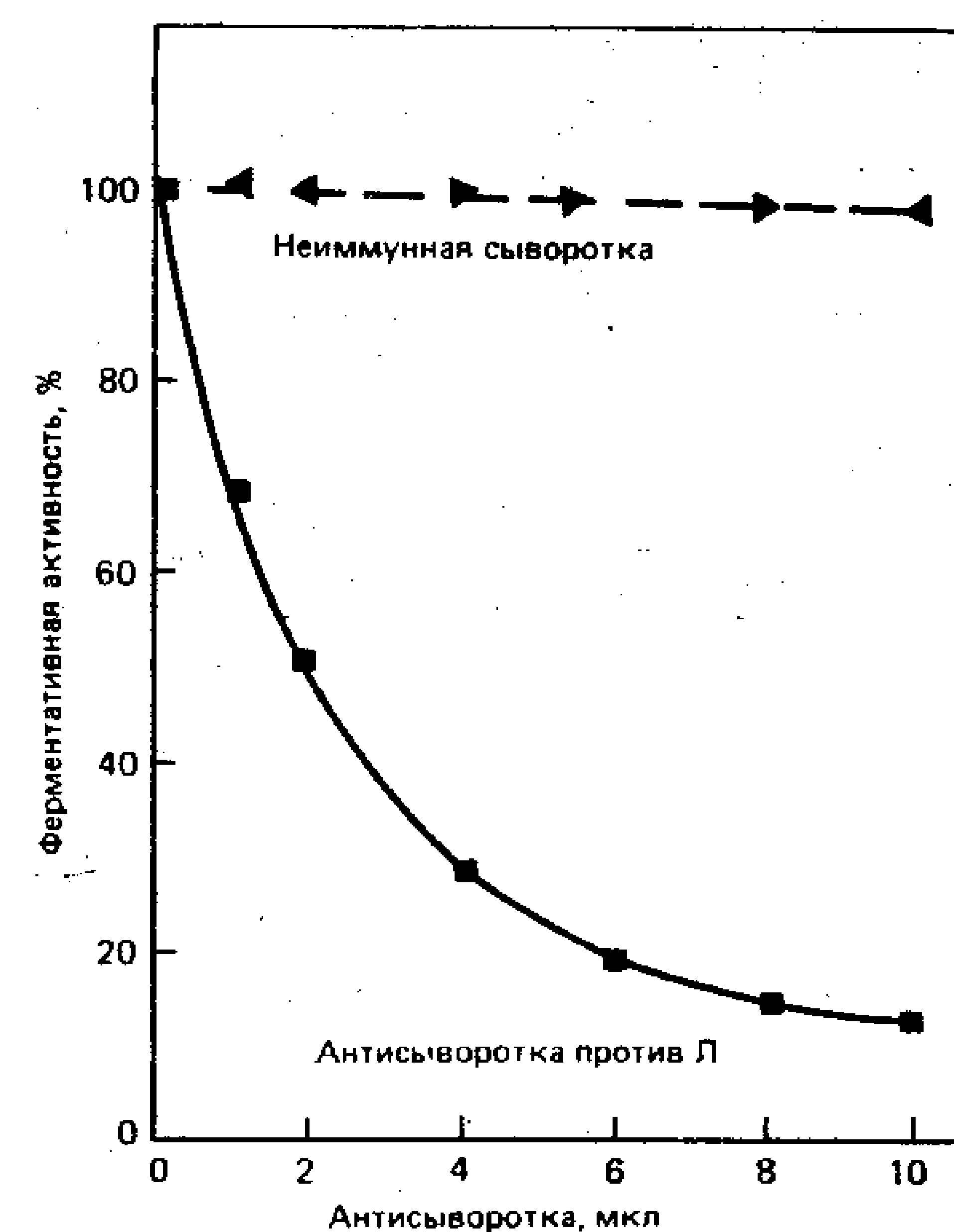


Рис. 5-3. Подавление антителами к Л активирующего действия FAD—Л на апоглюкозооксидазу. Концентрации апоглюкозооксидазы и FAD—Л постоянны.

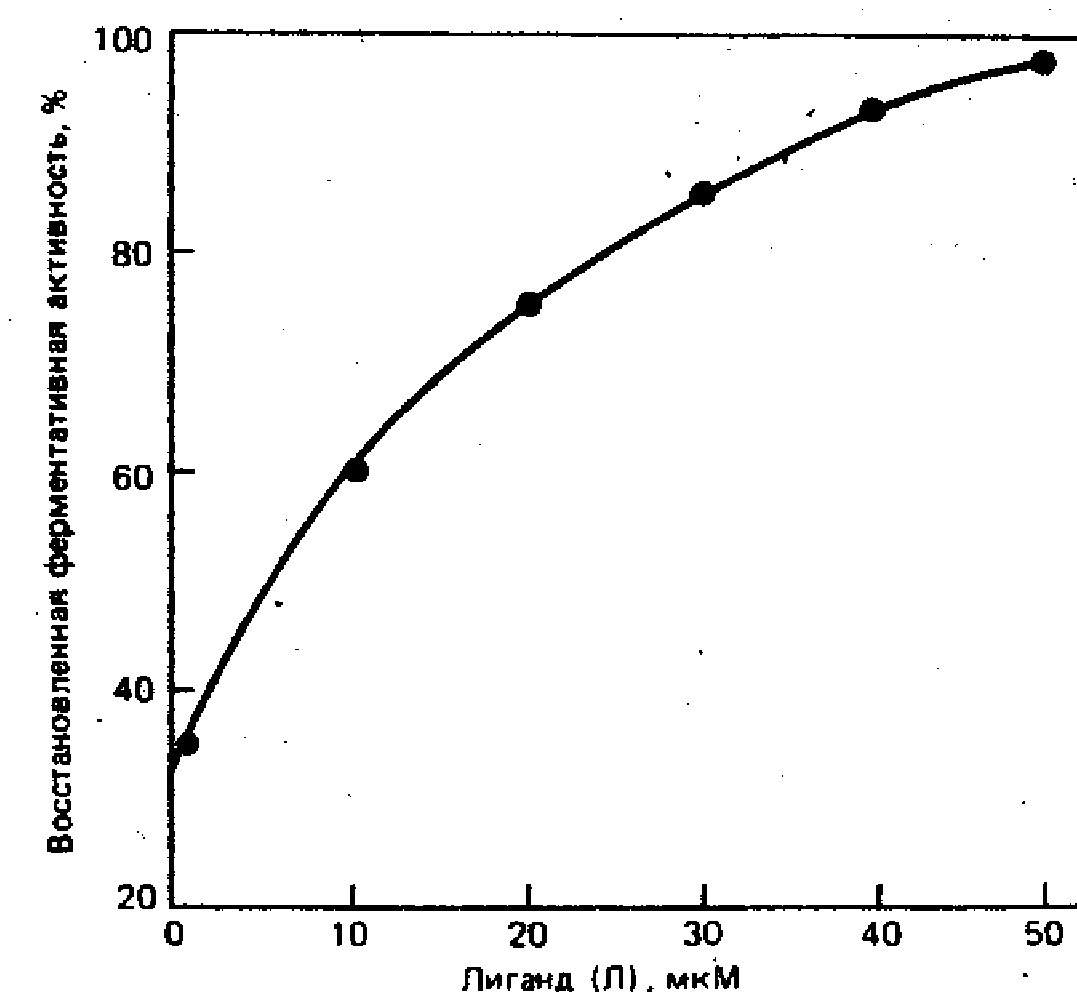


Рис. 5-4. Ослабление лигандом (Л) ингибирующего действия антител: стандартная кривая для определения лиганда с помощью ИФАПГ. Концентрации FAD—Л, антител к Л и апоглюкозооксидазы постоянны.

(Л) и FAD—Л сначала смешивают с антителами к Л и какое-то время инкубируют, а потом добавляют апоглюкозооксидазу и измеряют активность восстановленной гологлюкозооксидазы (Ngo et al., 1981).

Типичная калибровочная кривая для ИФАПГ приведена на рис. 5-4. В отсутствие определяемого лиганда (Л) активность восстановленного голофермента низка; как правило, она составляет только 20—50% максимальной активности. По мере увеличения концентрации Л активность голофермента растет и приближается к максимальной.

ИФАПГ с помощью индикаторных полосок

Тихач и др. (Tyhach et al., 1981) нанесли все необходимые для ИФАПГ реагенты на фильтровальную бумагу, наклеили узкие кусочки бумаги на пластиковую подложку и получили индикаторные полоски для ИФАПГ. С их помощью был успешно проведен иммуноанализ ДНФ-капроата, теофиллина и фенитоина на уровне микромолей по принципу «погружения и считывания». Результаты получали быстро, обычно через 5 мин после погружения индикаторной полоски в раствор образца.

Точность и достоверность

Точность метода ИФАПГ вполне удовлетворительна: коэффициент вариации равен в среднем 1,2—5,7% и 7,6—8,4% соответственно для одной и той же и для разных серий опытов. По точности метод сопоставим с другими вариантами иммуноферментного анализа и с радиоиммунологическим анализом. Достоверность результатов ИФАПГ также укладывается в допустимые пределы. Концентрации лигандов, найденные с помощью ИФАПГ, хорошо согласуются с результатами EMIT-анализа для теофиллина (гомогенного иммуноферментного анализа по методу компании Syva) и данными метода радиальной иммунодиффузии для IgG человека. Коэффициент корреляции во всех случаях >0,9.

Вещества, мешающие определению

Присутствующие в биологических системах вещества, такие, как флавинмононуклеотид (FMN), аденозинмонофосфат (AMP), аденозинтрифосфат (ATP), никотинамидадениндинуклеотид (NAD) и свободный рибофлавин могут ингибировать по конкурентному или бесконкурентному механизму рекомбинацию апофермента с FAD (Friedman, 1963). Поэтому следует исключить возможное присутствие этих ингибиторов в анализируемых образцах. Необходимо свести к минимуму воздействие кислот, оснований и света на FAD—Л (Friedman, 1963). Хорошо известно, что флавины в присутствии растворенного кислорода катализируют окисление многих веществ, например аминокислот, белков, ДНК, нуклеотидов и липидов (Hellis, 1982). О возможности такого процесса нельзя забывать.

Обсуждение

Иммуноферментный анализ с использованием простетических групп в качестве метки (ИФАПГ) представляет собой колориметрический иммуноанализ без разделения компонентов, основанный на ферментативном усилении сигналов. Метод прост и удобен, так как он не требует отделения меченных простетическими группами лигандов, связавшихся с антителами, от свободных, несвязанных лигандов. К тому же он легко поддается автоматизации. ИФАПГ можно проводить в режиме измерения скорости или с регистрацией поглощения через фиксированный отрезок времени. Он в равной мере пригоден для определения низкомолекулярных веществ, таких, как теофиллин (мол. масса 180), и высокомолекулярных веществ, таких, как иммуноглобулин G человека (мол. масса 160 000). Потенциальная чувствительность ИФАПГ очень высока, поскольку FAD—Л, связанный с апоглюкозооксидазой, подвергается циклическим реакциям окисления и восстановления в процессе каталитического окисления глюкозы с образованием H_2O_2 и глюконовой кислоты. Если субстраты, т. е. глюкоза и кислород, присутствуют в насыщающих концентрациях, то циклическое окисление—восстановление малого количества FAD—Л, связанного с апоферментом, будет приводить к выделению большого количества H_2O_2, которое можно измерить колориметрически с помощью чувствительных реакций, катализируемых пероксидазой.

Краткое содержание

Описан колориметрический метод иммуноферментного анализа без разделения компонентов, основанный на использовании в качестве метки простетической группы — FAD. Определяемый лиганд (Л) при ковалентном связывании с FAD образует прочный конъюгат FAD—Л, который может конкурировать с Л за антитела, специфичные к Л. В отсутствие Л основная часть конъюгата FAD—Л соединяется с антителами, утрачивая способность присоединяться к апоглюкозооксидазе с образованием каталитически активной гологлюкозооксидазы. Если же Л присутствует в высокой концентрации, он успешно конкурирует с FAD—Л за антитела. Количество FAD—Л, который остается в свободном виде, пропорционально концентрации лиганда. Не-

связанный FAD—Л, который служит аналогом простетической группы, может соединяться с апоглюкозооксидазой, регенерируя гологлюкозооксидазу. Следовательно, активность восстановленной гологлюкозооксидазы возрастает с увеличением концентрации лиганда.

Для определения ДНФ-капроата, теофиллина и фенитоина разработан также ИФАПГ по принципу «погружения и считывания», основанный на использовании индикаторных полосок.

Литература

Barham D., Trinder P. (1972). An improved color reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. Analyst, **97**, 142—145.

Cook C. E., Twine M. E., Myers M., Amerson E., Kepler J. A., Taylor G. F. (1976). Theophylline radioimmunoassay: synthesis of antigen and characterization of antiserum, Res. Comm. Chem. Patol. Pharmacol., **13**, 497—504.

Friedman H. C., 1963. Flavin-adenine dinucleotide. In: Methods of Enzymatic Analysis, H. U. Bergmeyer, ed., Verlag Chemie, Weinheim, Vol. 4, pp. 2182—2185.

Geoghegan W. D., Struve M. F., Jordan R. E. (1983). Adaptation of Ngo—Lenhoff peroxidase assay for solid phase ELISA, J. Immunol. Methods, **60**, 61—68.

Hellis P. F. (1982). The photophysical and photochemical properties of flavins (isoalloxazines). Chem. Soc. Rev., **11**, 15—39.

Massey V., Mendelsohn L. D. (1979). Immobilized glucose oxidase and D-amino acid oxidase: a convenient method for the purification of flavin adenine dinucleotide and its analogs, Anal. Biochem., **95**, 156—159.

Morris D. L., Carrico R. J., Ellis P. B., Hornby W. E., Schroeder H. R., Ngo T. T., Boguslaski R. C., 1980. Colorimetric immunoassays with flavin adenine dinucleotide as label. In: Innovative approaches to clinical analytical chemistry, Lab Professional Series, American Chemical Society.

Morris D. L., Ellis P. B., Carrico R. J., Yeager F. M., Schroeder H. R., Albarella J. P., Boguslaski R. C., Hornby W. E., Rawson D. (1981). Flavin adenine dinucleotide as a label in homogeneous colorimetric immunoassays, Anal. Chem., **53**, 658—665.

Ngo T. T. et al. (1981). Reference 22 in Anal. Chem., **53**, 1981, 658—665 and reference 12 in Applied Biochem. Biotech., **7**, 1982, 401—414.

Ngo T. T., Lenhoff H. M. (1980a). Amperometric determination of picomolar levels of flavin adenine dinucleotide by cyclic oxidation-reduction in apo-glucose oxidase system, Anal. Letters, **13**, 1157—1165.

Ngo T. T., Lenhoff H. M. (1980b). A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions, Anal. Biochem., **105**, 389—397.

Ngo T. T., Lenhoff H. M. (1981). Recent advances in homogeneous and separation-free enzyme immunoassays, Applied Biochem. Biotechnol., **6**, 53—64.

Ngo T. T., Lenhoff H. M. (1982). Enzymes as versatile labels and signal amplifiers for monitoring immunochemical reactions, Mol. Cell. Biochem., **44**, 3—12.

Okuda J., Nagamine J., Yagi K. (1979). Exchange of free and bound coenzyme of flavin enzymes studied with [^{14}C] FAD, Biochim. Biophys. Acta, **566**, 245—252.

Solomon B., Levin Y. (1976). Flavin-protein interaction in bound glucose oxidase, J. Solid-Phase Biochem., **1**, 159—171.

Tyhach R. J., Rupchock P. A., Pendergrass J. H., Skjold A. C., Smith P. J., Johnson R. D., Albarella J. P., Profitt J. A. (1981). Adaptation of prosthetic-group-label homogeneous immunoassay to reagent-strip format, Clin. Chem., **27**, 1499—1504.

Глава 6

Иммуноферментный анализ без разделения компонентов, основанный на использовании в качестве метки флуорогенных субстратов: определение гаптенов и макромолекул

Т. Т. Нго, Р. К. Вонг

Введение

Общие положения

В иммуноферментном анализе без разделения компонентов с применением в качестве метки флуорогенных субстратов (ИФАФС) (метод называют также флуоресцентным иммуноанализом с использованием в качестве метки субстратов) маркером служит модифицированный флуорогенный субстрат фермента, образующий с определяемым лигандом прочный ковалентный конъюгат (Boguslaski et al., 1980; Burd, 1981). Таким образом, метод отличается от большинства вариантов иммуноферментного анализа тем, что в роли метки выступает субстрат, а не фермент (Ngo, Lenhoff, 1981, 1982). Чтобы флуорогенный субстрат можно было использовать в качестве метки для ИФАФС, необходимо соблюдение двух важных условий: 1) модифицированный флуорогенный субстрат при ковалентном связывании с определяемым лигандом должен сохранять чувствительность к действию фермента; 2) после соединения с антителами, специфичными к лиганду, конъюгат субстрата с определяемым лигандом уже не должен служить субстратом для фермента. Согласно определению, флуорогенный субстрат фермента не флуоресцирует при длинах волн, используемых для регистрации, однако продукт ферментативной реакции интенсивно флуоресцирует в этой части спектра. В ИФАФС конъюгат [субстрат—определяемый лиганд] играет роль модифицированного субстрата, способного связываться с активным центром фермента и превращаться в детектируемый продукт. Кроме того, конъюгат ведет себя как аналог лиганда и может конкурировать с определяемым лигандом за места связывания на специфических антителах.

На основе производного умбеллиферил-β-галактозида, который является флуорогенным субстратом β-галактозидазы *E. coli*, было разработано несколько удобных методов ИФАФС для анализа лекарственных веществ и иммуноглобулинов.

Принцип ИФАФС

Прочный ковалентный конъюгат флуорогенного субстрата фермента с лигандом (С—Л) конкурирует с определяемым веществом (Л) за присутствующие в ограниченной концентрации

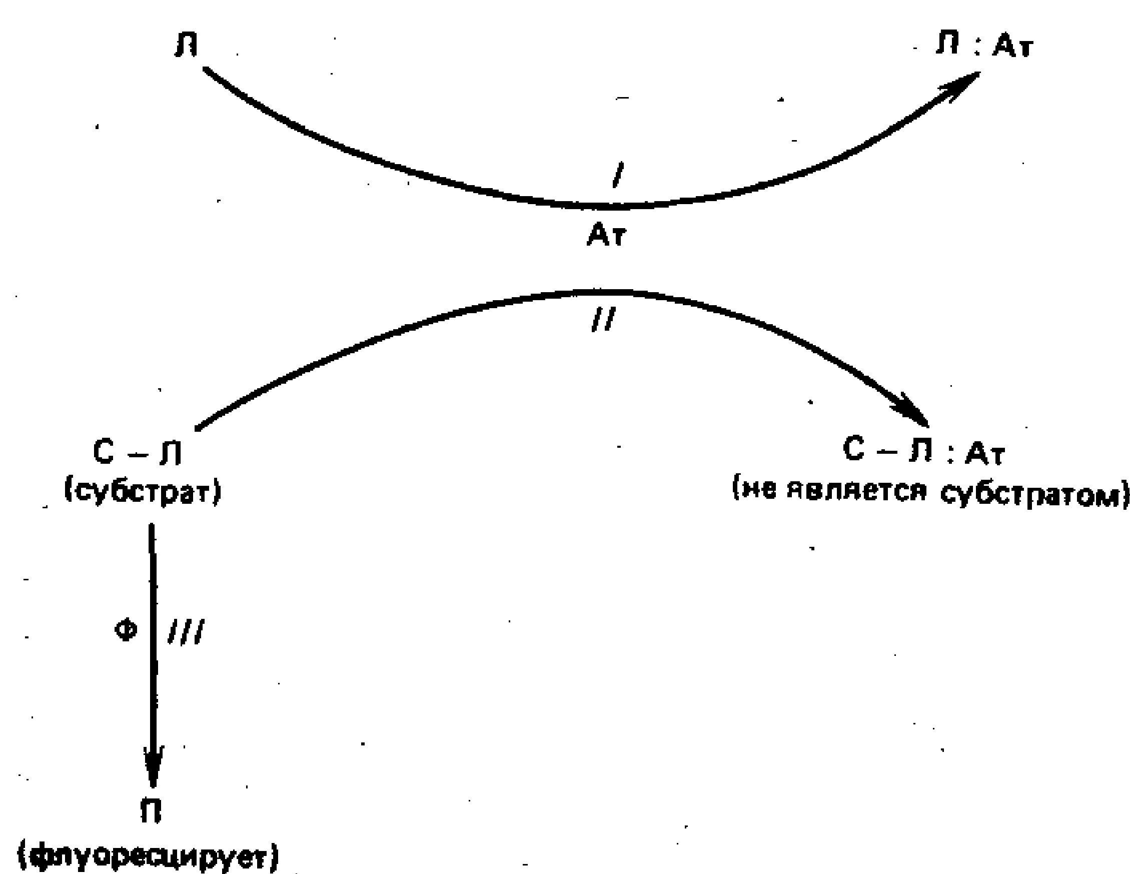


Рис. 6-1. Принцип ИФАФС.

антитела (Ат) против Л. Таким образом, по реакциям *I* и *II* (рис. 6-1) образуются комплексы Л : Ат и С—Л : Ат. Свободный, несвязанный конъюгат С—Л представляет собой хороший флуорогенный субстрат фермента (Ф), чего нельзя сказать об С—Л, связанном с антителами (С—Л:Ат). В отсутствие определяемого лиганда С—Л соединяется с Ат, поэтому индикаторная реакция не протекает и флуоресценции не наблюдается (или она очень слаба). По мере увеличения концентрации анализируемого лиганда все бóльшая часть С—Л остается в свободном состоянии и может служить флуорогенным субстратом для фермента; в результате по ферментативной реакции *III* образуется все больше флуоресцирующих продуктов. Таким образом, интенсивность флуоресценции возрастает с повышением концентрации определяемого лиганда, что и отражает калибровочная кривая ИФАФС.

Материалы и методы

Ферменты

В ИФАФС чаще всего применяют β-галактозидазу *E. coli*. Это очень устойчивый фермент: при хранении в присутствии антибактериальных агентов при 4 °С его активность за 12 мес почти не уменьшается. В одном из вариантов ИФАФС используют также FAD-пирофосфатазу, катализирующую гидролиз флавинадениндинуклеотида до флавинмононуклеотида и аденозинмонофосфата.

Синтез карбокси-производных умбеллиферил-β-D-галактозида

Для получения β-[7-(3-карбоксикумаринокси)]-D-галактозида (рис. 6-2, *V*) — карбокси-производного умбеллиферил-β-D-галактозида, проводили реакцию между 3-карбоэтокси-7-гидроксикумарином (рис. 6,2 *III*) и 2,3,4,6-тетраацетил-α-D-галактозилбромидом (рис. 6-2, *IV*) согласно методике, разработанной для синтеза метилумбеллиферил-β-D-галактозида (Leaback, 1965). 3-Карбоэтокси-7-гидроксикумарин (рис. 6-2, *III*) получа-

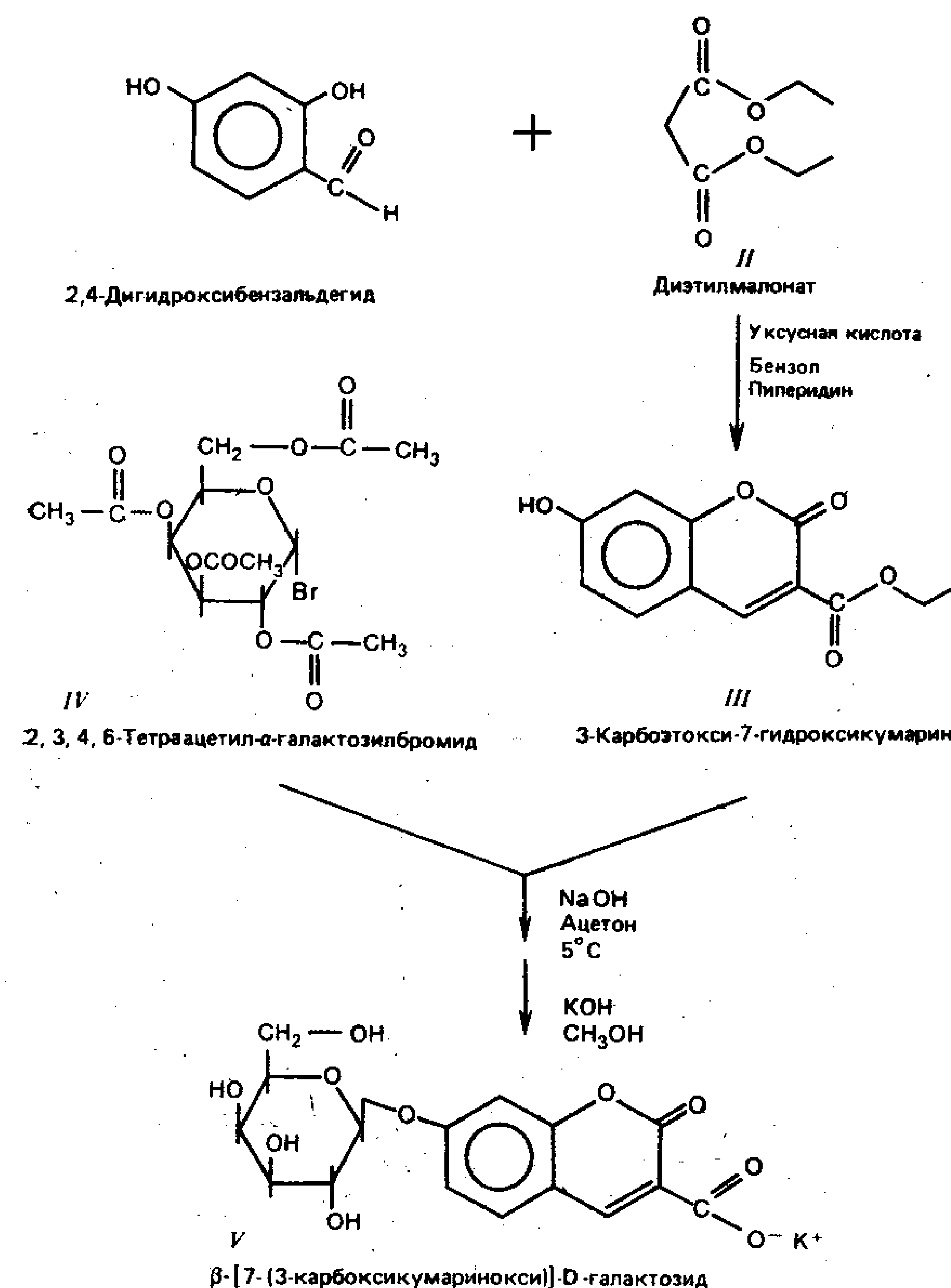


Рис. 6-2. Синтез β-[7-(3-карбоксикумаринокси)]-D-галактозида.

ли из 2,4-дигидроксибензальдегида (рис. 6-2, *I*) и диэтилмалоната (рис. 6-2, *II*), подвергая их конденсации Кневенагеля в смеси уксусной кислоты, бензола и пиперидина (Cope et al., 1941).

Синтез конъюгата флуорогенного субстрата фермента с определяемым лигандом (С — Л)

Общая стратегия синтеза С—Л включает либо непосредственное связывание активированного по карбоксильной группе β-[7-(3-карбоксикумаринокси)]-D-галактозида (сокращенно β-ККГ) (рис. 6-2, *V*) с аминогруппой определяемого лиганда, либо присоединение β-ККГ к определяемому лиганду через «ножку» и/или бифункциональный сшивающий агент. Анализируемый лиганд может представлять собой низкомолекулярное вещество, например лекарственный препарат (мол. масса <1000) или высокомолекулярное вещество, такое, как IgG или IgM человека (мол. масса >150 000).

Синтез С — Л путем непосредственного связывания β-ККГ с определяемым лигандом, содержащим аминогруппу

Ряд конъюгатов β-ККГ с аминогликозидными антибиотиками был получен в результате непосредственного присоединения β-ККГ к аминогруппе антибиотиков (рис. 6-3) с помощью водорастворимого конденсирующего агента — 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (Burd et al., 1977). В другом варианте карбоксильную группу β-ККГ сначала активируют, проводя реакцию с N-гидроксисукцинимидом в безводном полярном органическом растворителе и используя в качестве конденсирующего агента N,N′-дициклогексилкарбодиимид (рис. 6-4). Затем N-гидроксисукцинимидный эфир β-ККГ присоединяют непосредственно к аминогруппе тобрамицина (Burd et al., 1978) или амикацина (Thompson, Burd, 1980). Карбоксильная группа β-ККГ активируется также при образовании смешанного ангидрида с этилхлорформиатом. Этот ангидрид вводят в реакцию с 5-[2-(4-аминобутоксифенил)]-5-фенилгидантоином (Wong et al., 1979).

Непрямое связывание β-ККГ с макромолекулами

Чтобы облегчить взаимодействие между активным центром фермента и β-ККГ, связанным с макромолекулой, между β-ККГ и макромолекулой помещают «ножку», благодаря чему остаток β-ККГ становится более доступным. Роль «ножки» играет 1,6-гександиамин (рис. 6-5, *II*), который сначала соединяют с β-ККГ (рис. 6-5, *I*), получая 6-(7-β-галактозилкумарин-3-карбоксамидо)гексиламин (β-ГКГА); конденсирующим агентом в

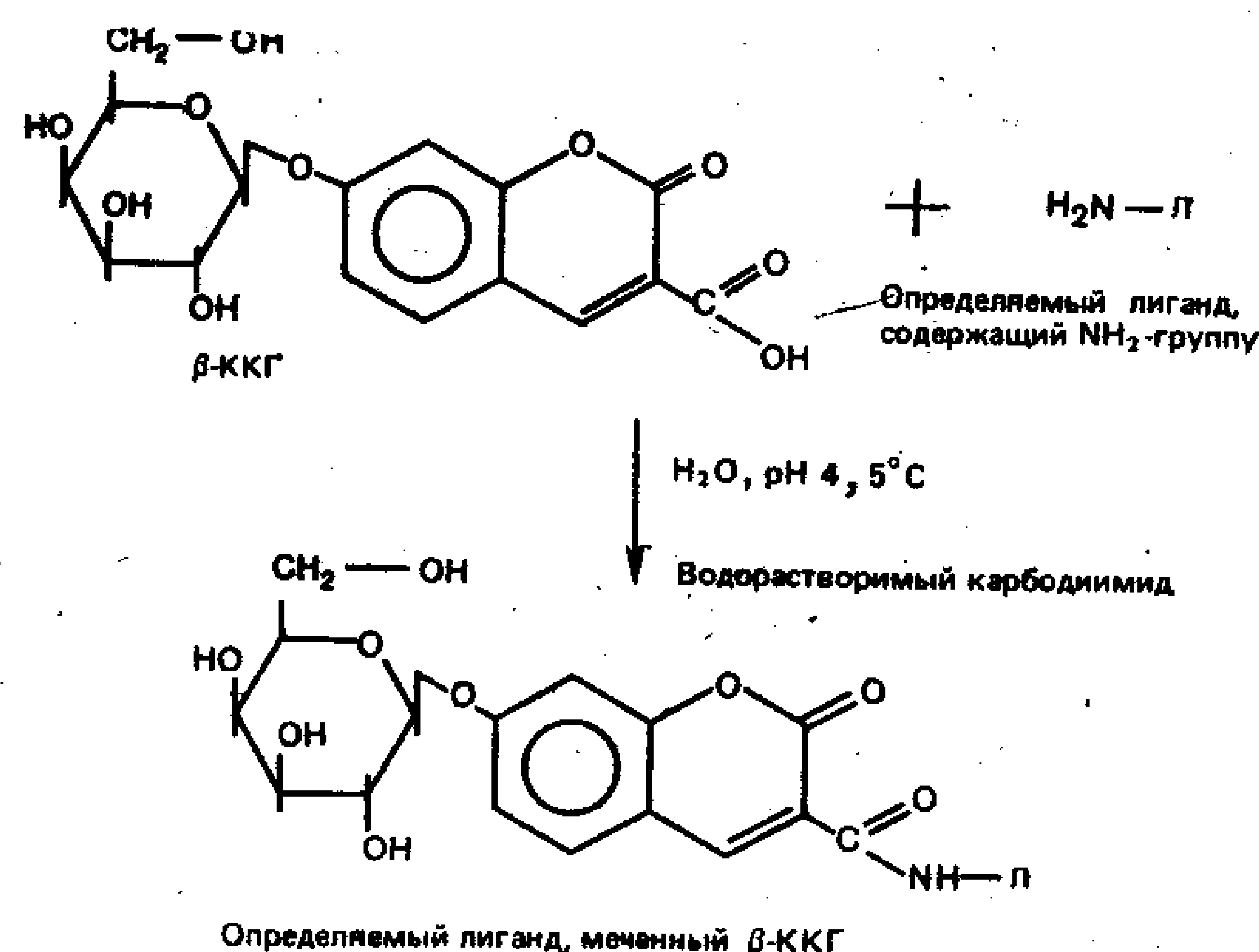


Рис. 6-3. Синтез определяемого лиганда, меченного β-ККГ, в присутствии водорастворимого карбодиимида.

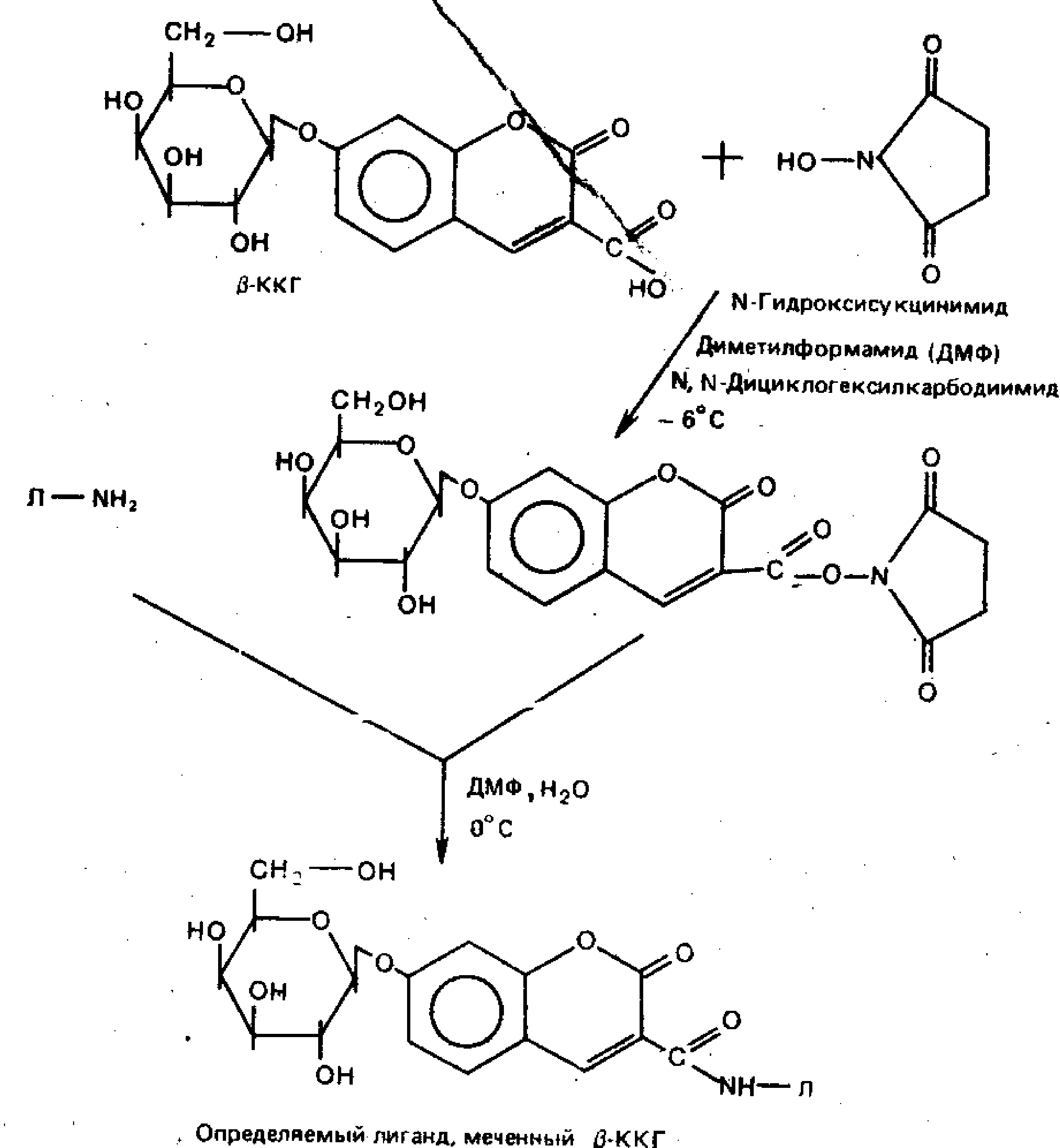


Рис. 6-4. Синтез определяемого лиганда, меченного β-ККГ, через промежуточную стадию образования N-гидроксисукцинимидного эфира.

этой реакции служит 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид. Затем производное субстрата вводят в реакцию с эквимолярным количеством гомобифункционального сшивающего агента — диметиладипимидата (рис. 6-5, *III*) и вскоре после этого смешивают с раствором высокомолекулярного вещества (рис. 6-5, *IV*). Макромолекулы, меченные субстратом, отделяют от непрореагировавших производных субстрата методом гель-хроматографии (Ngo et al., 1981).

Стандартные методики проведения ИФАФС

Существуют две стандартные методики для анализа веществ с помощью ИФАФС. Первую используют при определении низкомолекулярных лигандов (гаптенов). Вторая предназначена для анализа высокомолекулярных лигандов (макромолекул).

А. Методика ИФАФС для гаптенов (рис. 6-6, *А*). Анализируемый образец разбавляют (1 : 50) с помощью 2,5 мл 50 мМ буфера Bicine[1], pH 8,2, содержащего в качестве консерванта

---

[1] Bicine — торговое название N,N-бис(2-гидроксиэтил)-глицина. — *Прим. перев.*

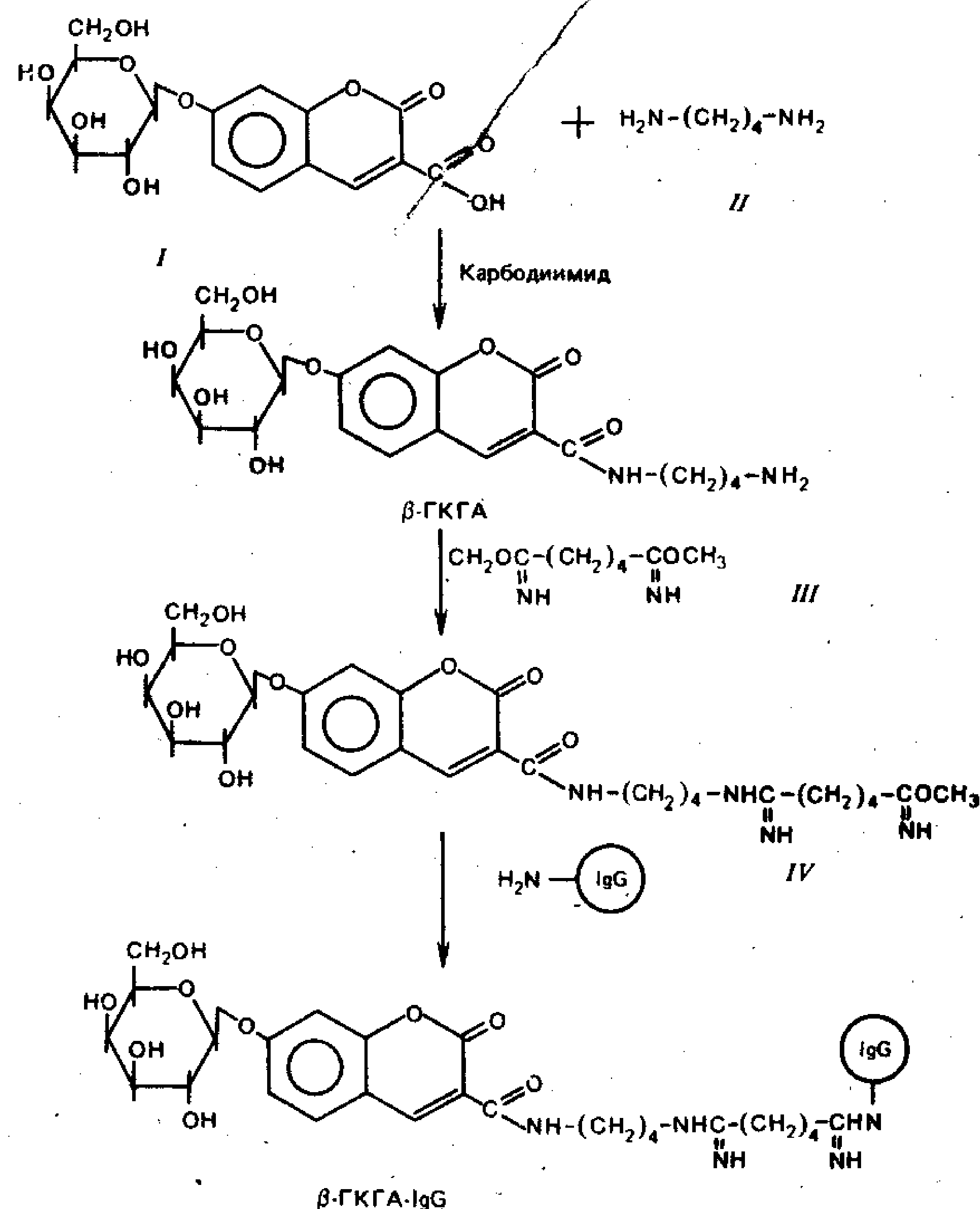


Рис. 6-5. Схема присоединения метки β-ГКГА к IgG.

0,1% азида натрия. Разбавленный образец (50 мкл) прибавляют к 1,0 мл раствора, содержащего антитела против определяемого лиганда и фермент — β-галактозидазу *E. coli*. После перемешивания инициируют ферментативную реакцию добавлением 50 мкл раствора конъюгата [флуорогенный субстрат — определяемый лиганд; (С—Л)] и 0,5 мл буфера. Реакцию проводят при комнатной температуре (22 °С) от 5 мин до нескольких часов, как правило 20—30 мин. Кроме только что описанного варианта с фиксированным временем инкубации возможен аналогичный вариант ИФАФС с измерением начальных скоростей реакций. Указанные выше объемы реагентов рекомендованы в инструкции, прилагаемой к набору для анализа, однако можно использовать и другие объемы.

Б. Методика ИФАФС для макромолекул (рис. 6-6, *Б*). Анализируемый образец разбавляют тем же буфером Bicine, после чего смешивают 100 мкл разбавленного образца с 3 мл раствора конъюгата [флуорогенный субстрат — определяемый лиганд; (С—Л)]. Затем добавляют 100 мкл разбавленного раствора антител и тщательно перемешивают. Наконец, инициируют флуорогенную реакцию прибавлением раствора фермента. Выдерживают при комнатной температуре 20—30 мин и измеряют флуоресценцию.

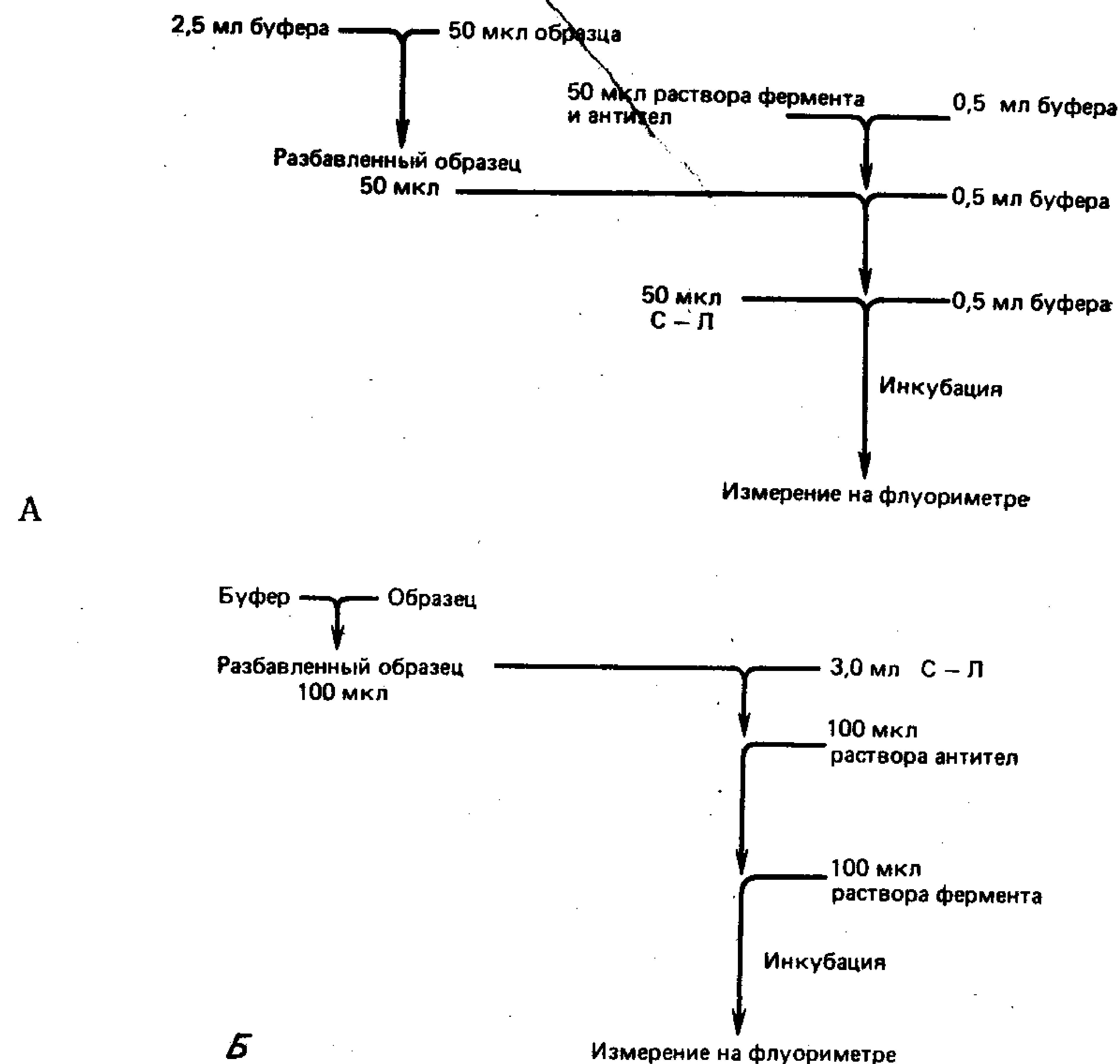


Рис. 6-6. *А*. Методика ИФАФС для определения гаптенов. *Б*. Методика ИФАФС для определения макромолекул.

В обеих методиках флуоресценцию возбуждают при 400 нм, а испускание регистрируют при 450 нм.

Результаты

Спектры поглощения конъюгата [флуорогенный субстрат — определяемый лиганд] до и после ферментативного гидролиза

А. Конъюгаты [β-ККГ — гаптен]. Спектры поглощения связанных с β-ККГ гаптенов, таких, как [β-ККГ — гентамицин], [β-ККГ — тобрамицин], [β-ККГ — амикацин], [β-ККГ — фенитоин] и т. д., обладают характерным максимумом поглощения

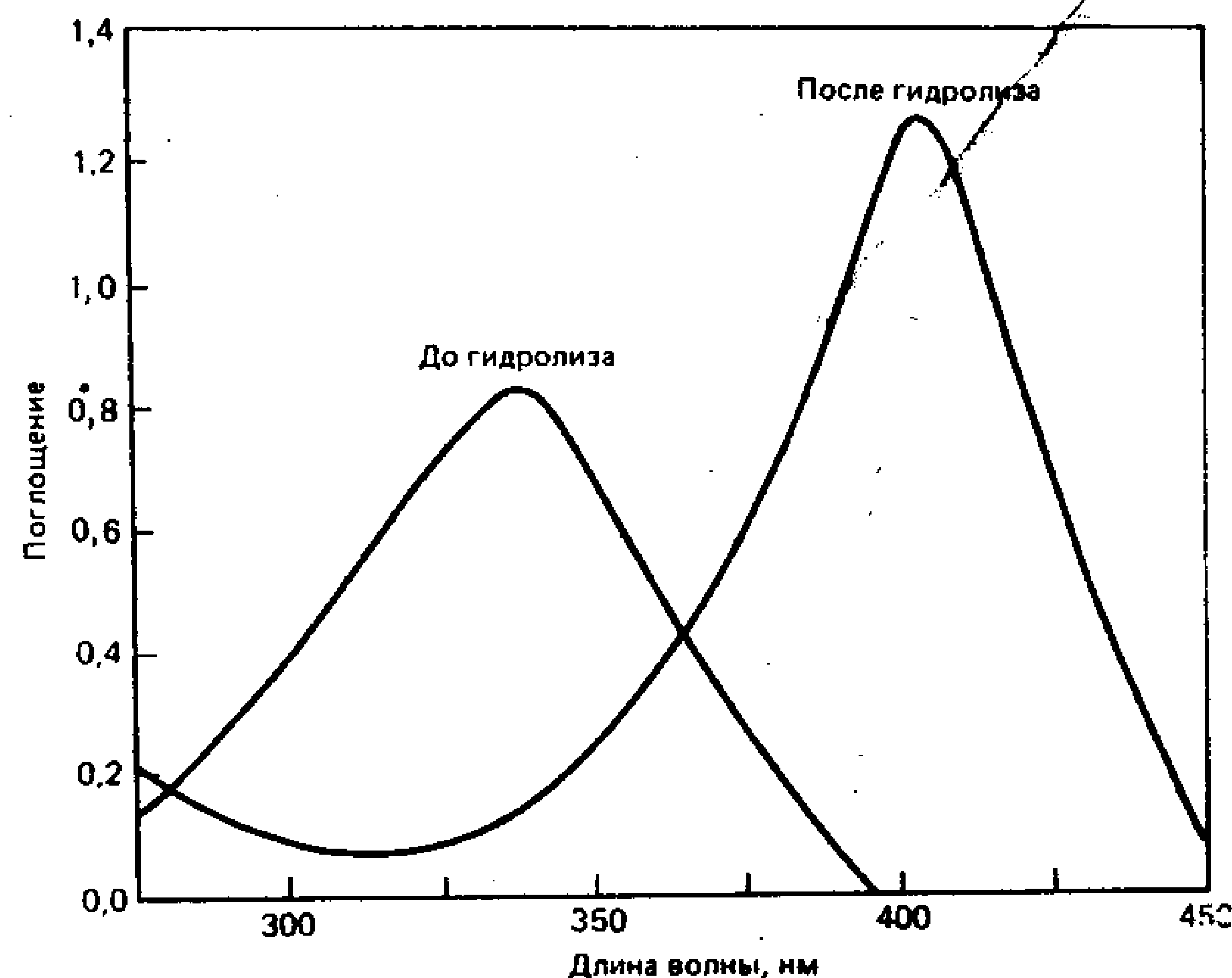


Рис. 6-7. Спектры поглощения β-ККГ — фенитоина до и после гидролиза β-галактозидазой в буфере Bicine, pH 8,5.

в области 343 нм (рис. 6-7). После обработки конъюгатов [β-ККГ — гаптен] ферментом, т. е. после ферментативного отщепления β-галактозильной группы, поглощение при 343 нм уменьшается, но появляется новый пик поглощения при 403 нм (рис. 6-7). Этот пик, примерно в 1,5 раза превосходящий по интенсивности пик при 343 нм в исходном спектре, характерен для диссоциированного (ионизованного) кумарина.

Б. Конъюгаты β-ГКГА с макромолекулами. Получены два конъюгата β-ГКГА с макромолекулами, а именно [β-ГКГА — IgG человека] и [β-ГКГА — IgM человека]. Спектры поглощения этих конъюгатов имеют максимумы поглощения при 278 и 340 нм. Пик при 278 нм обусловлен главным образом поглоще-

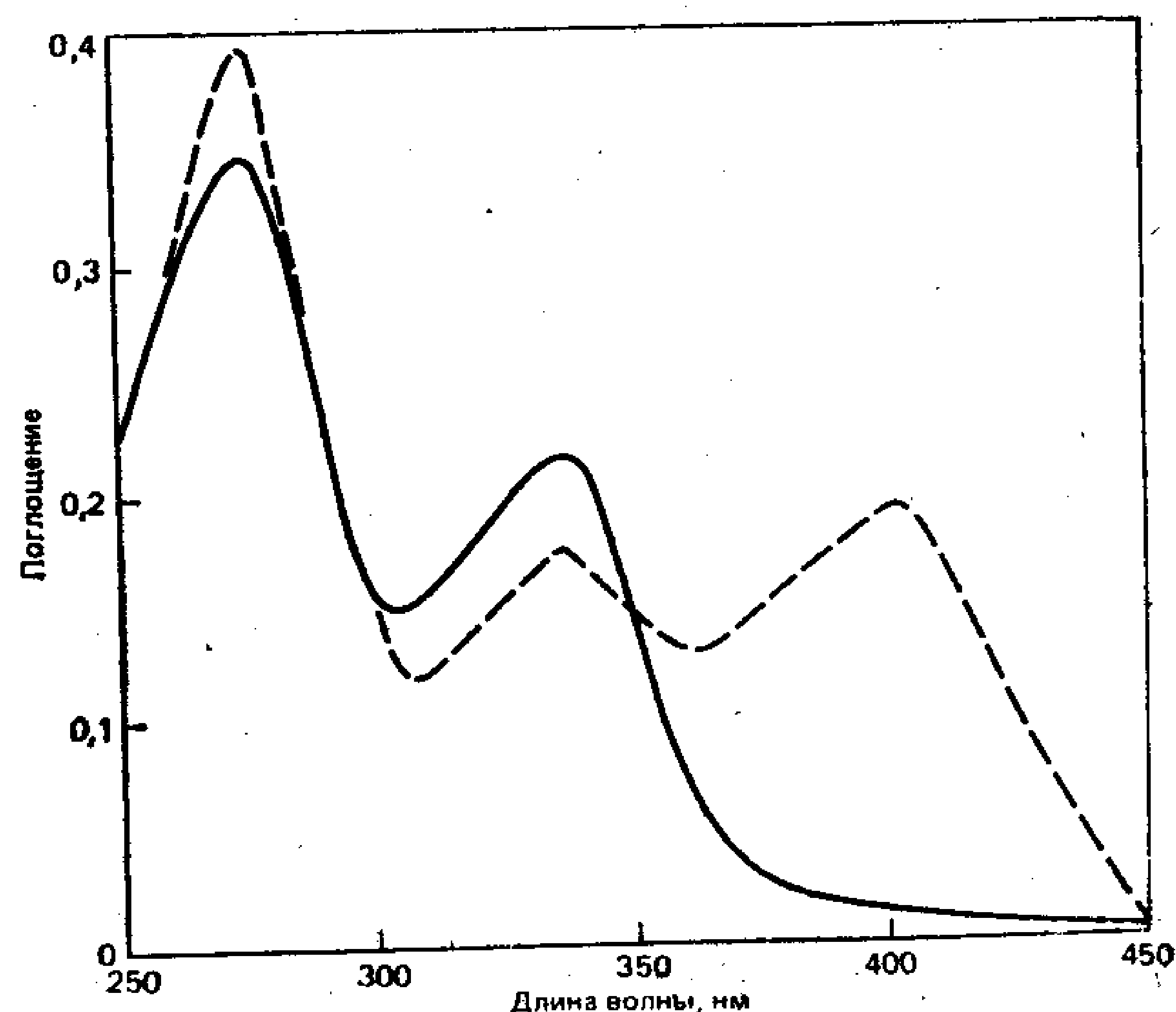


Рис. 6-8. Спектры поглощения β-ГКГА-IgG в 50 мМ буфере Bicine, pH 8,2, до (сплошная линия) и после (прерывистая линия) обработки β-галактозидазой (0,5 МЕ) в течение 30 мин при комнатной температуре.

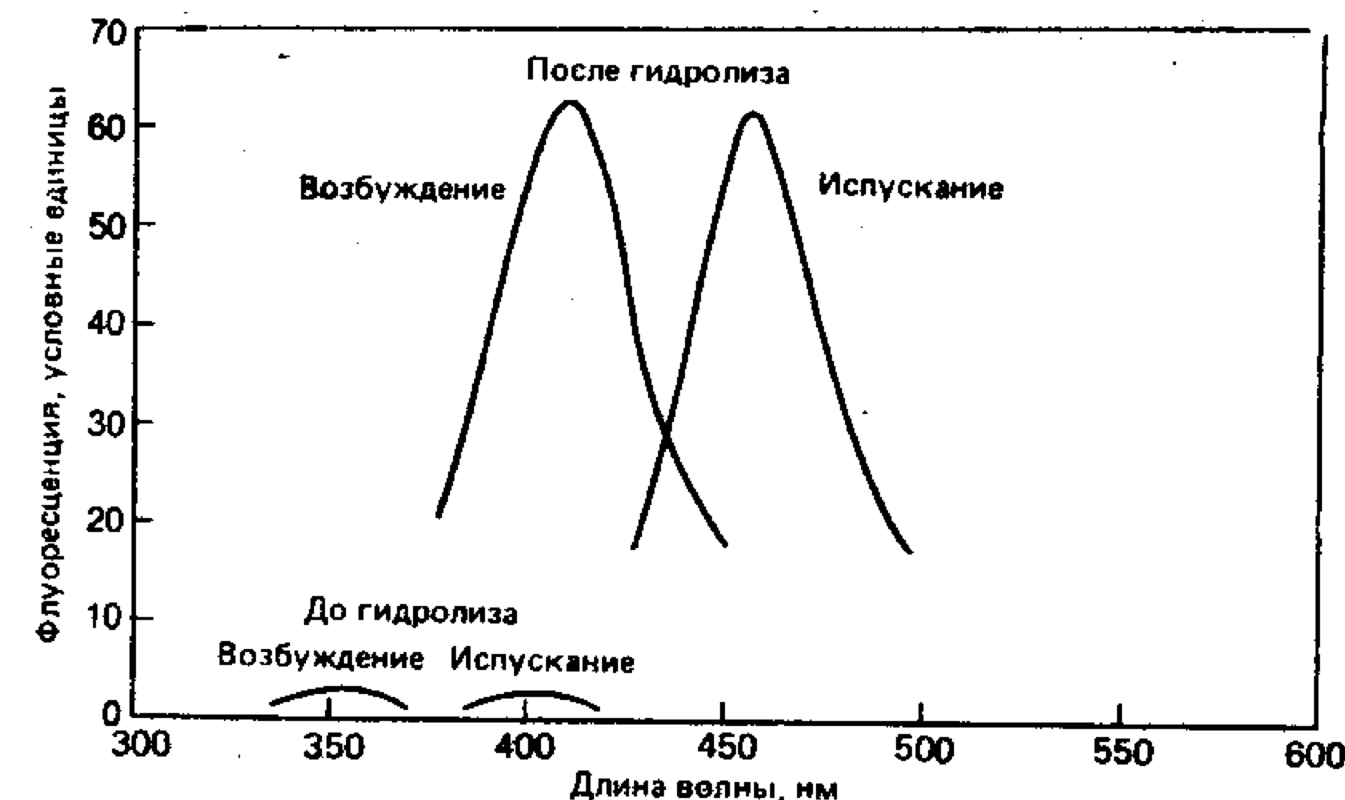


Рис. 6-9. Спектры флуоресценции β-ККГ — фенитоина в 50 мМ буфере Bicine, pH 8,2, до и после гидролиза β-галактозидазой.

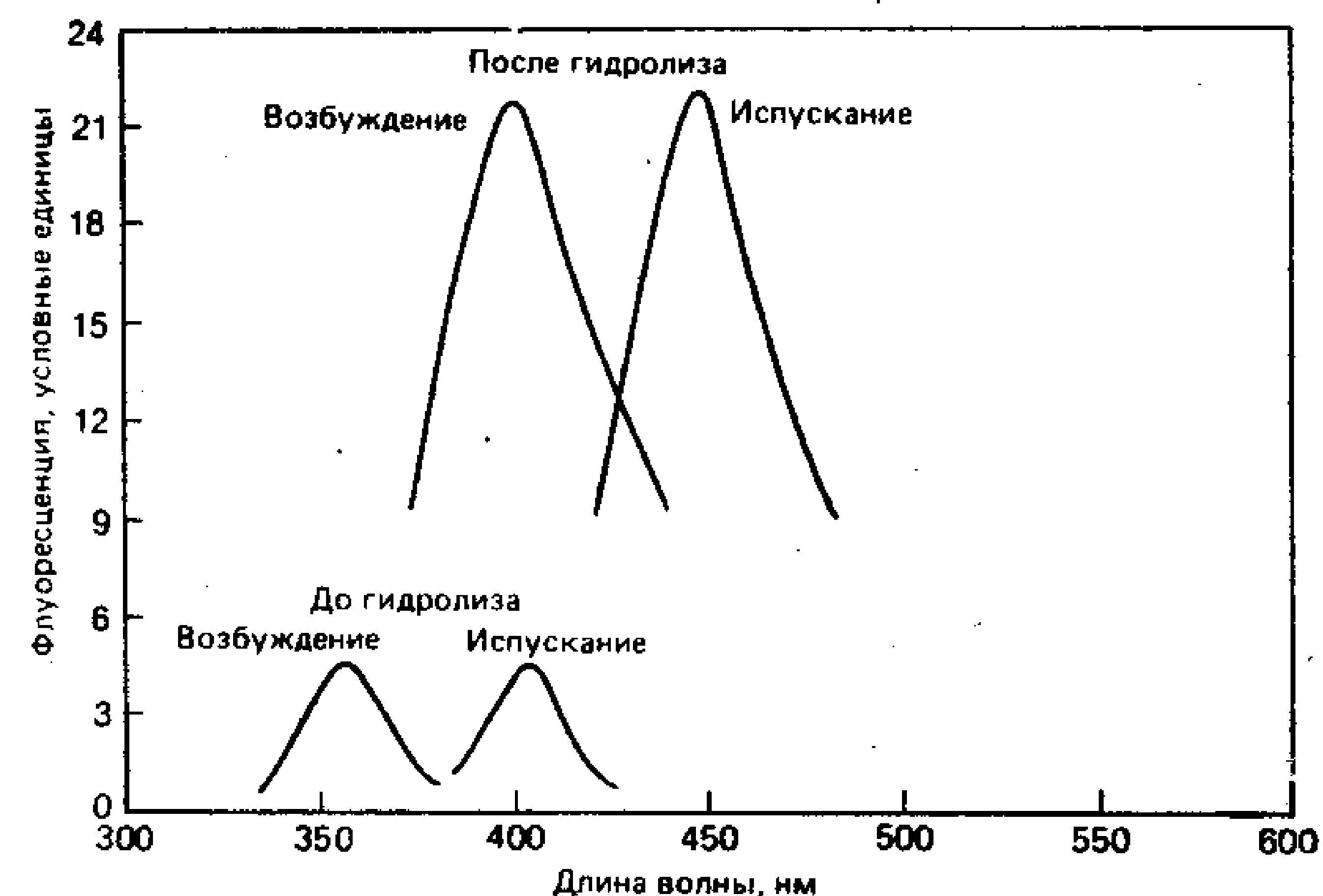


Рис. 6-10. Спектры флуоресценции β-ГКГА — IgG до и после гидролиза β-галактозидазой в 50 мМ буфере Bicine, pH 8,2.

нием остатков ароматических аминокислот, содержащихся в иммуноглобулинах, а пик при 340 нм характерен для галактозильного производного умбеллиферона (рис. 6-8). Исходя из интенсивностей этих двух пиков поглощения, а также из коэффициентов экстинкции иммуноглобулинов и β-ГКГА при соответствующих длинах волн, было вычислено молярное соотношение иммуноглобулинов и связанного с ними β-ГКГА, которое обычно составляет 6—7 молей β-ГКГА на 1 моль мономерной субъединицы иммуноглобулина. После обработки макромолекулярных конъюгатов β-ГКГА β-галактозидазой поглощение при 340 нм уменьшается, а при 400 нм появляется новый пик (рис. 6-8). Ферментативному гидролизу было подвергнуто ~50% связанного β-ГКГА.

Спектры флуоресценции конъюгата [флуорогенный субстрат — определяемый лиганд] до и после ферментативного гидролиза

Из спектров флуоресценции конъюгатов [β-ККГ — гаптен] и [β-ГКГА — макромолекула] видно, что максимумы возбуждения и испускания находятся при 365 и 405 нм соответственно

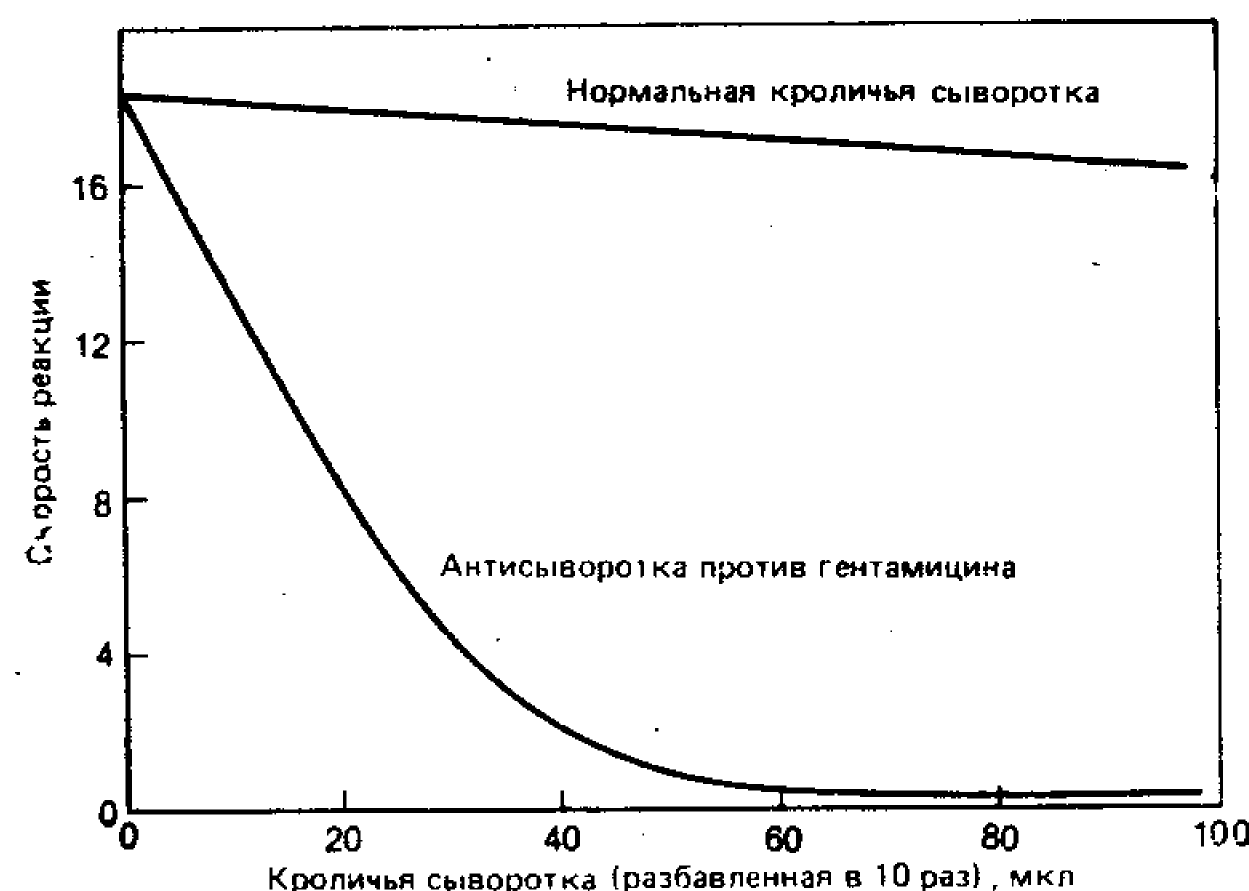


Рис. 6.11. Титрование антисыворотки к гентамицину с помощью связанного с β-ККГ сисомицина — аналога гентамицина. К 2,0 мл 50 мМ буфера Bicine, содержащего 50 нг β-галактозидазы, прибавляли различные количества разбавленной в 10 раз кроличьей антисыворотки против гентамицина или нормальной кроличьей сыворотки. После добавления 50 мкл β-ККГ — сисомицина измеряли скорость реакции.

(рис. 6-9, 6-10). Однако после ферментативного гидролиза, т. е. после удаления β-галактозильных групп, максимумы возбуждения и испускания у обоих конъюгатов смещаются к 405 и 450 нм соответственно. Кроме того, сильно возрастает интенсивность испускания (рис. 6-9, 6-10). В условиях анализа, когда для возбуждения выбирают длину волны 400 нм, а испускание регистрируют при 450 нм, конъюгаты [β-ККГ — гаптен] и [β-ГКГА — макромолекула] не проявляют заметной флуоресценции, пока не произойдет ферментативного отщепления β-галактозильных групп.

Титрование антител против лиганда с помощью конъюгата [флуорогенный субстрат — определяемый лиганд]

Ковалентное присоединение флуорогенных субстратов фермента β-ККГ или β-ГКГА к аналогам определяемого лиганда не сказывается на иммунологических свойствах лиганда, т. е. с нативным и с меченым лигандом специфические антитела связываются одинаково. При титровании антител против анализируемого лиганда постоянными количествами фермента и лиганда, конъюгированного с флуорогенным субстратом, с ростом концентрации антител наблюдается уменьшение флуоресценции раствора. Нормальные иммуноглобулины, т. е. иммуноглобулины неиммунизированного животного, на флуоресценцию раствора не влияют или влияют очень слабо (рис. 6-11). Как видно из рис. 6-11, в результате связывания флуорогенного конъюгата со специфическими антителами суммарная флуоресценция может снизиться более чем на 90%.

Конкуренция за связывание; калибровочные кривые

В ИФАФС концентрацию лиганда обычно определяют путем сравнения флуоресценции исследуемого образца с флуоресценцией серии стандартных растворов, содержащих точно извест-

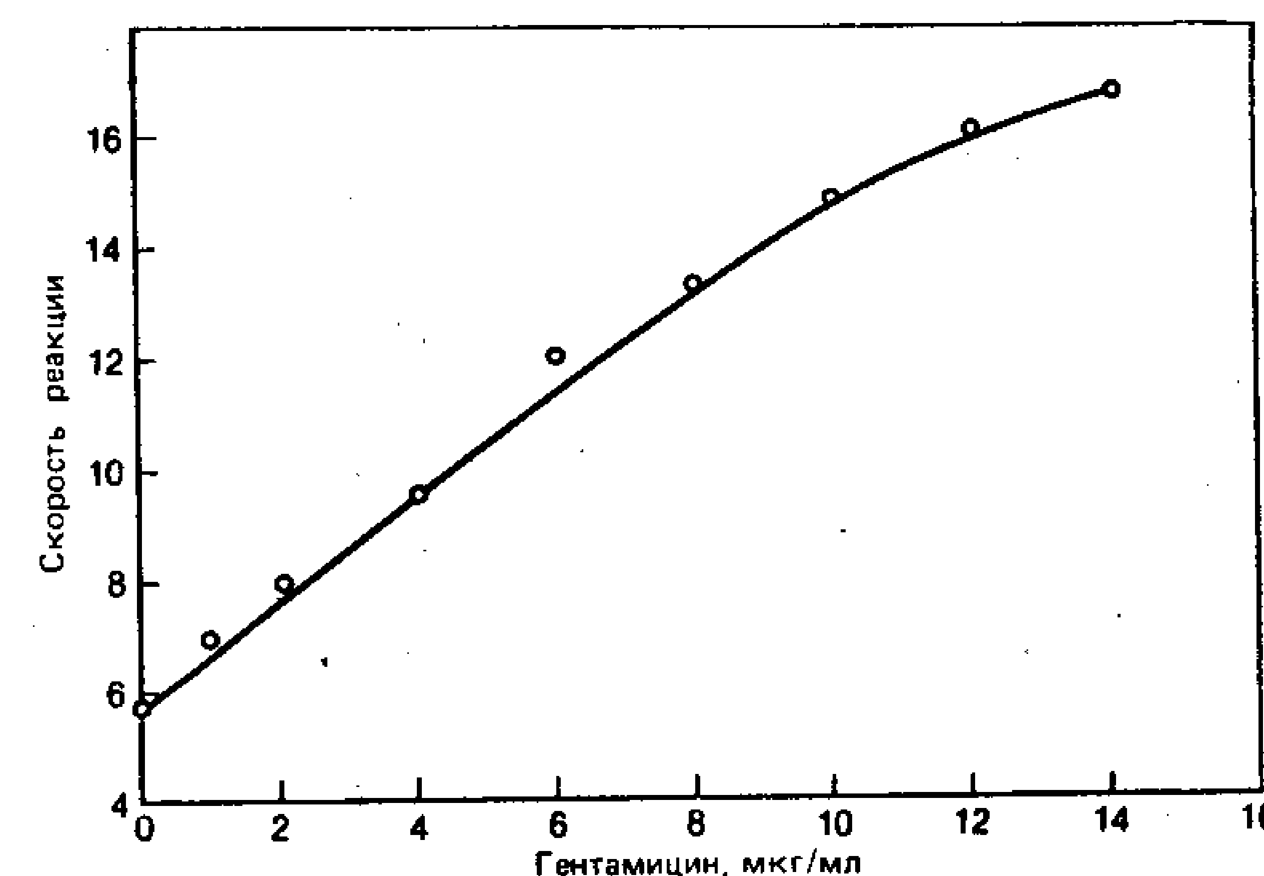


Рис. 6-12. Типичная для ИФАФС калибровочная кривая (на примере гентамицина), полученная методом измерения начальных скоростей.

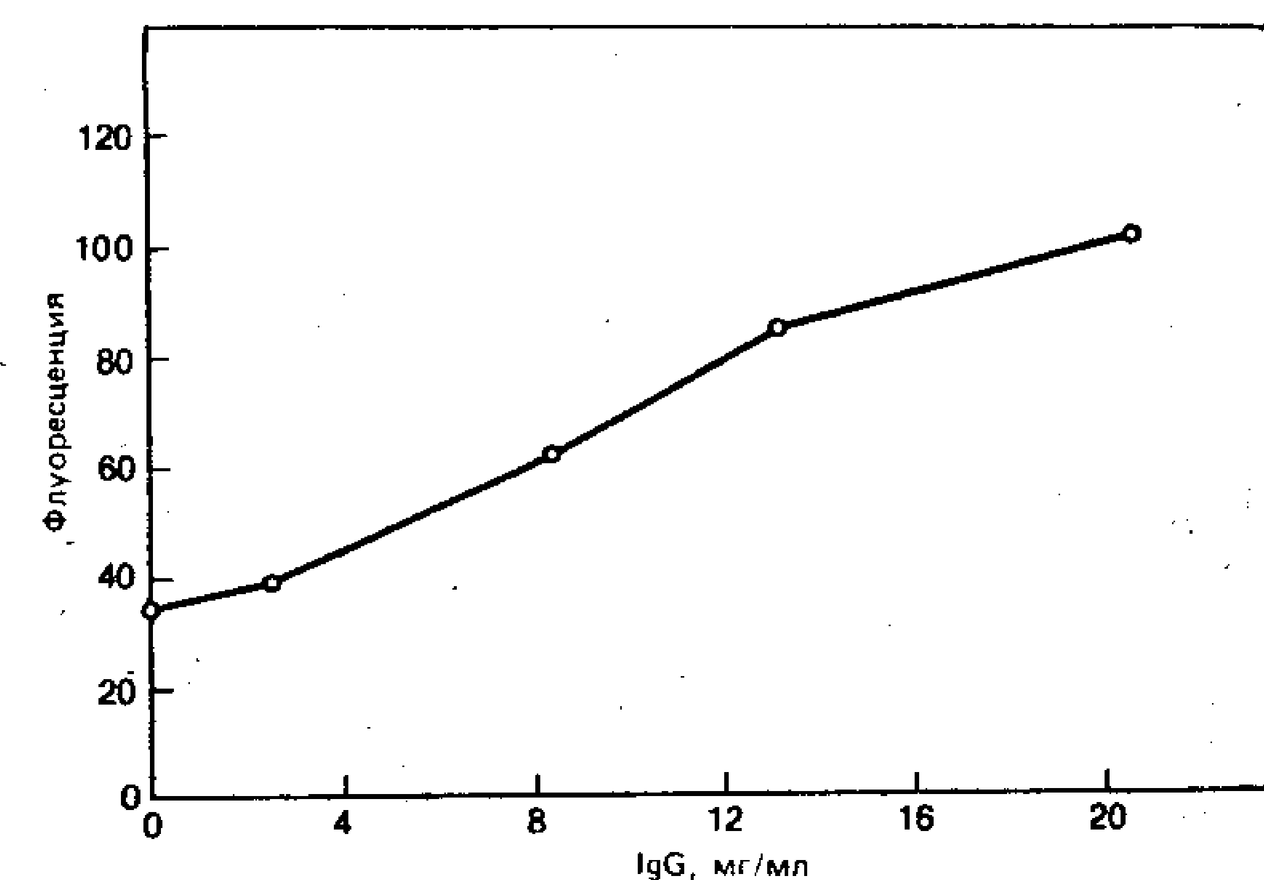


Рис. 6-13. Калибровочная кривая для определения IgG по методике с фиксированным временем инкубации.

ные количества лиганда. При этом концентрации фермента, конъюгата [флуорогенный субстрат — определяемый лиганд], а также антител к определяемому лиганду стремятся поддерживать постоянными. Целенаправленно варьируют только концентрацию анализируемого лиганда. Как правило, антитела добавляют в количестве, достаточном для уменьшения суммарной флуоресценции на 70—90%.

На рис. 6-12 представлена типичная калибровочная кривая для определения гентамицина методом ИФАФС с измерением начальных скоростей (Burd et al., 1977). Калибровочная кривая для анализа высокомолекулярного вещества — IgG человека — методом ИФАФС с фиксированным временем инкубации приведена на рис. 6-13 (Ngo et al., 1981).

Точность ИФАФС

Точность определения гаптенов и макромолекул методом ИФАФС иллюстрирует табл. 6-1. При сравнении результатов,

Таблица 6-1. Точность ИФАФС

Определяемое вещество	Концентрация определяемого вещества, мкг/мл	Результаты, полученные в один день			Результаты, полученные в разные дни		
		среднее значение, мкг/мл	S, мкг/мл	V, %	среднее значение, мкг/мл	S, мкг/мл	V, %
А. Гаптены							
Гентамицин (Burd et al., 1977)	2,0	1,7	0,6	35,3	1,8	0,3	16,7
	6,0	6,0	0,3	5,0	6,0	0,5	8,3
	10,0	9,7	0,5	5,1	10,1	0,7	6,9
Тобрамицин (Burd et al., 1978)	2,0	2,0	0,1	5,0	2,0	0,3	15,0
	6,0	6,0	0,2	3,3	6,0	0,4	6,7
	10,0	10,0	0,2	2,0	10,0	0,6	6,0
Амикацин (Thompson et al., 1980)	5,0	4,7	0,3	6,9	4,7	0,2	4,7
	15,0	15,8	0,4	2,4	15,8	0,2	1,2
	30,0	31,7	0,7	2,3	31,7	1,0	3,2
Канамицин (de Castro et al., 1984)				<3,8			
Фенитоин (Wong et al., 1979)	5,0	4,8	0,25	5,2	5,1	0,65	12,7
	15,0	15,3	0,59	3,9	15,3	1,09	7,1
	25,0	25,5	1,41	5,5	23,7	1,04	4,4
(Wong et al., 1980)	5.0	4,7	0,25	5,3			
	15.0	15,4	0,37	2,4			
	25,0	25,2	0,81	3,2			
Люминал (Krausz et al., 1980)	50,0	50,9	2,72	4,5	50,9	2,96	5,8
	20,0	20,2	0,81	4,0	20,2	0,75	3,7
	10,0	9,7	0,44	4,6	9,7	0,36	3,7
Карбамазепин (Li et al., 1982)	4,0	4,1	0,2	5,5	3,5	0,1	3,5
	12,0	12,1	0,2	1,6	11,6	0,2	1,9
	16,0	15,8	0,5	2,9	15,8	0,4	2,3
Примидон (Johnson et al., 1981)	4.0			<6			<6
	12,0			<6			<6
	16,0			<6			<6
Вальпроевая кислота (Feinstein et al., 1982)	40,0			6,2			
	80,0			6,3			
	120,0			3,5			
Этосуксимид (Pahuski et al., 1982)				2,8—4,5			3,2—4,5
Теофиллин (Li et al., 1981)	5,0	4,7	0,13	2,8	4,7	0,21	4,5
	15,0	15,6	0,33	2,1	15,2	0,34	2,3
	25,0	24,6	0,26	1,0	24,0	0,63	2,6
Кофеин (Benovic et al., 1982)				5,7—9,9			
Теофиллин (твердофазный анализ) (Walter et al., 1983)	5,0		0,42	8,4		0,42	8,4
	15,0		0,57	3,8		0,56	3,7
	25,0		0,90	3,6		0,90	3,6
Хинидин (Csiszar et al., 1981)	4,0			3,3			1,2
	6,0			4,4			1,2
	8,0			6,9			4,4

Продолжение табл. 6.1

Определяемое вещество	Концентрация определяемого вещества, мкг/мл	Результаты, полученные в один день			Результаты, полученные в разные дни		
		среднее значение, мкг/мл	S, мкг/мл	V, %	среднее значение, мкг/мл	S, мкг/мл	V, %
Дизопирамид (Lima et al., 1984)	1,5	1,4		4,3			
	3,0	3,1		1,9			
	7,0	7,2		2,9			
Дибекацин (Place et al., 1983)	2,0	1,8	0,08	4,6	1,9	0,12	6,5
	6,0	6,1	0,08	1,3	6,1	0,06	1,1
	14,0	14,3	0,34	2,4	14,0	0,24	1,7
Б. Макромолекулы							
IgG (Ngo et al., 1981)		2,3	0,41	18,3	2,2	0,27	12,2
		10,3	0,45	4,4	10,2	0,64	6,3
		20,7	1,62	7,8	20,4	1,07	5,2
IgM (Worah et al., 1981)		0,6	1,10	15,9	0,6	0,09	14,9
		2,1	0,15	7,1	1,5	0,15	9,8
		3,1	0,22	7,0	3,0	0,30	10,0

полученных в один и тот же день или в разные дни, стандартное отклонение и коэффициент вариации лежат в допустимых для иммуноанализа пределах.

Аналитическое обнаружение и влияние разбавления образцов

Данные об аналитическом обнаружении и роли разбавления образцов позволяют оценить влияние их главных компонентов на точность и достоверность ИФАФС. Как следует из табл. 6-2, аналитическое обнаружение в пределах ошибки опыта было количественным, а разбавление образцов не оказывало существенного влияния на результаты ИФАФС (табл. 6-3).

Достоверность

Результаты, полученные методом ИФАФС, были сопоставлены с точки зрения достоверности с данными микробиологических испытаний, газовой хроматографии (ГХ), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), EMIT-анализа, радиоиммунологического анализа (РИА) и радиальной иммунодиффузии (РИД). Так, на рис. 6-14 показана корреляция между результатами ИФАФС и EMIT-анализа при определении гаптена — фенитоина в клинических образцах сыворотки (Wong et al., 1979). При анализе высокомолекулярного вещества —

Таблица 6.2. Аналитическое обнаружение при использовании ИФАФС

Определяемое вещество	Число образцов	Обнаружение, %	
		диапазон значений	среднее значение
Гентамицин (Burd et al., 1977)	18	87,7—109,0	97,9
Амикацин (Thompson et al., 1980)		93,0—113,0	
Фенитоин (Wong et al., 1979)	15	97,2—123,2	107,8
Люминал (Krausz et al., 1980)	15	92,5—108,0	100,4
Теофиллин (Li et al., 1981)	20	91,3—110,0	103,0
Дибекацин (Place et al., 1983)	1		100,6
IgG (Ngo et al., 1981)	6	96,0—107,0	101,2
IgM (Worah et al., 1981)	4	91,2—105,0	99,4

Таблица 6.3. Влияние разбавления образцов на результаты ИФАФС

Определяемое вещество	Число измерений	Процент от истинного значения, полученный после умножения на степень разбавления
Гентамицин (Burd et al., 1977)	15	97,2
Фенитоин (Wong et al., 1979)	15	94,2
Теофиллин (Li et al., 1981)	15	102,5
IgG (Ngo et al., 1981)	17	95,3
IgM (Worah et al., 1981)	26	98,5

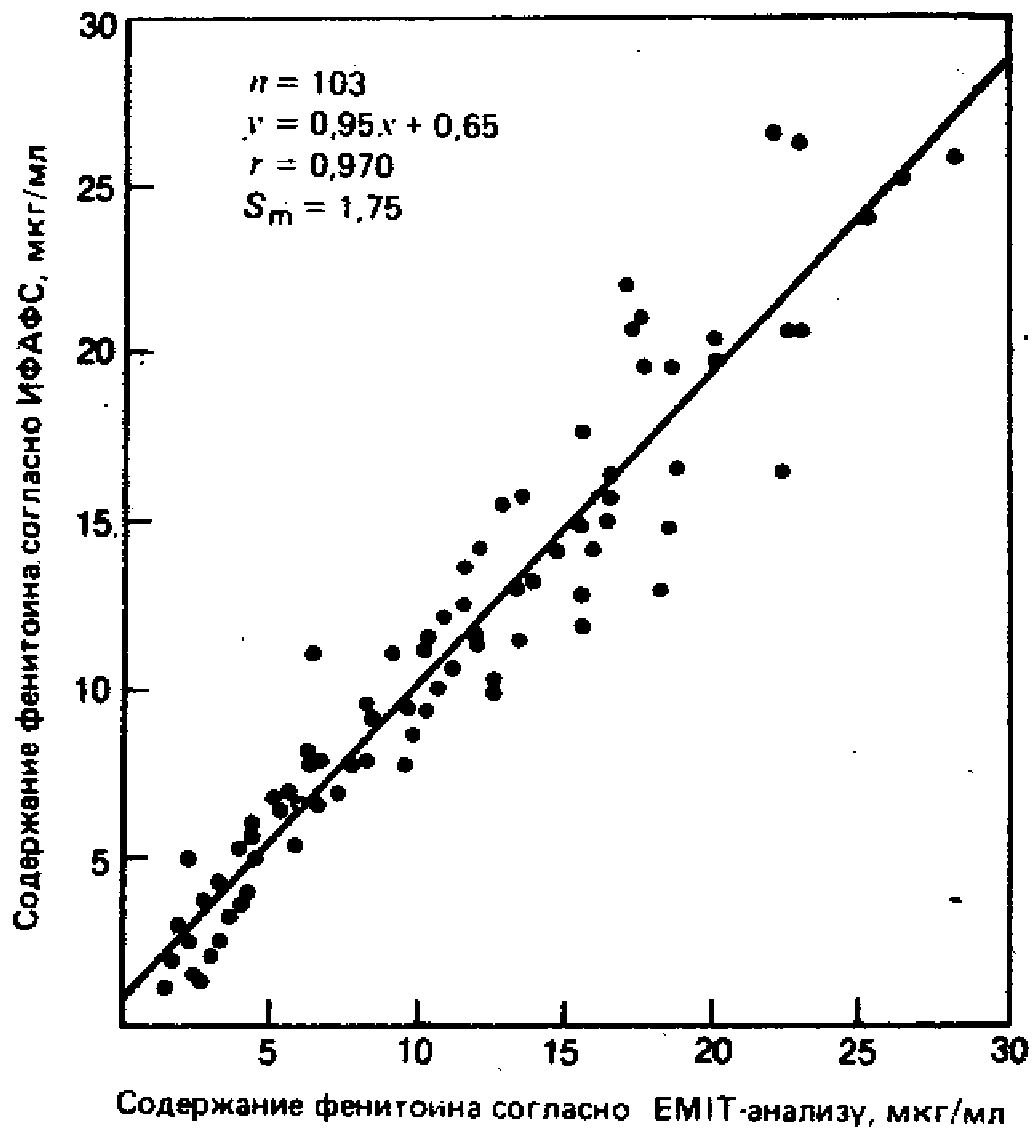


Рис. 6-14. Корреляция между результатами ИФАФС и EMIT-анализа при определении фенитоина в сыворотке человека.

IgG человека — столь же хорошая корреляция наблюдалась между ИФАФС и РИД (рис. 6-15) (Ngo et al., 1981). В табл. 6-4 суммированы данные о достоверности определения гаптенов и макромолекул методом ИФАФС в сравнении с другими методами, причем эти данные для указанного числа образцов (n) выражены через коэффициент корреляции (r), стандартную ошибку (S_m) и корреляционное уравнение.

Обсуждение результатов

Показано, что флуорогенные субстраты ферментов представляют собой удобные маркеры для иммуноферментного анализа

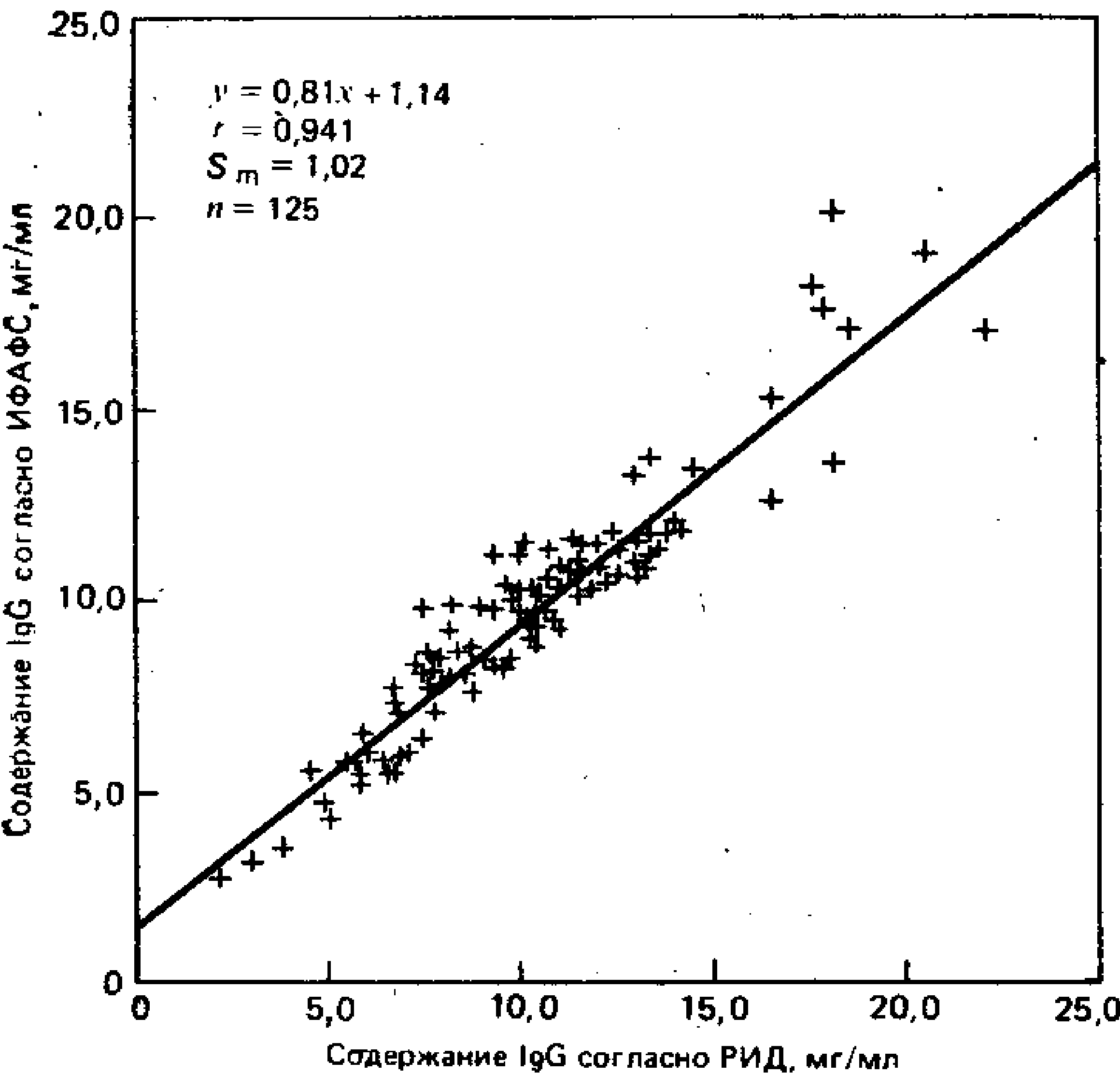


Рис. 6-15. Сравнение данных РИД и ИФАФС по определению содержания IgG в сыворотке человека.

Таблица 6-4. Достоверность ИФАФС

Определяемое вещество	Сопоставляемый метод	n	Уравнение	r	S_m
А. Гаптены					
Гентамицин (Burd et al., 1977)	РИА	66	$y=1,07x-0,19$	0,94	0,66
Тобрамицин (Burd et al., 1978)	РИА	53	$y=0,88x+0,20$	0,99	0,41
	Микробиол.	53	$y=0,99x+0,40$	0,97	0,71
Амикацин (Thompson et al., 1980)	РИА	93	$y=0,95x+0,15$	0,99	1,55
Канамицин (de Castro et al., 1984)	РИА			0,99	
	ВЭЖХ			0,98	
Фенитоин (Wong et al., 1979) (Wong et al., 1980)	ГХ	136	$y=1,01x+0,80$	0,98	1,57
	EMIT	103	$y=0,95x+0,65$	0,97	1,75
	ГХ	45	$y=1,06x-0,45$	0,99	1,17
	ВЭЖХ	37	$y=0,96x-0,25$	0,99	1,35
	EMIT	67	$y=0,99x-0,68$	0,97	2,26
	РИА	34	$y=1,01x-1,69$	0,98	2,57
Люминал (Krausz et al., 1980)	EMIT	102	$y=1,11x-2,71$	0,97	2,32
Карбамазепин (Li et al., 1982)	ВЭЖХ	45	$y=1,10x+1,21$	0,97	0,77
	ГХ	56	$y=1,01x-0,30$	0,95	0,99
	EMIT	53	$y=1,07x-0,82$	0,98	0,51
Примидон (Johnson et al., 1981)	EMIT	97	$y=1,11x-0,59$	0,98	
	ГХ	97	$y=0,94x-0,34$	0,98	
Вальпроевая кислота (Pahuski et al., 1983)	ГХ		$y=1,08x-2,5$	0,99	
Этосуксимид (Pahuski et al., 1983)	ГХ		$y=1,04x-1,19$	0,93	
Теофиллин (Li et al., 1981)	ГХ	85	$y=0,97x+0,82$	0,97	1,74
	EMIT	92	$y=1,06x-1,18$	0,99	1,60
Кофеин (Benovic, 1982)	ВЭЖХ	26	$y=0,95x-0,02$	0,94	0,83
Теофиллин (твердофазный анализ)	EMIT	50	$y=1,06x-1,31$	0,99	2,07
(Greenquist et al., 1981) (Walter et al., 1983)	ВЭЖХ	30	$y=1,02x+0,09$	0,98	1,72
Хинидин (Csiszar et al., 1981)	EMIT	84	$y=1,04x-0,07$	0,97	0,36
Дизопирамид (Lima et al., 1984)	ВЭЖХ	67	$y=1,00x+0,19$	0,95	
Дибекацин (Place et al., 1983)	ВЭЖХ	151	$y=0,94x+0,24$	0,99	0,36
Б. Макромолекулы					
IgG (Ngo et al., 1981)	РИД	125	$y=0,81x+1,14$	0,94	1,02
IgM (Worah et al., 1981)	РИД	87	$y=0,96x+9,60$	0,96	0,22

без разделения компонентов. Примером может служить карбоксильное производное умбеллиферил-β-галактозида — β-[7-(3-карбоксикумаринокси)]-D-галактозид (β-ККГ), являющийся флуорогенным субстратом β-галактозидазы *E. coli*. На основе этого субстрата разработано несколько методов иммуноанализа без разделения реакционной смеси, предназначенных для определения гаптенов и макромолекул (табл. 6-1 и 6-4). ИФАФС, привлекающий своей простотой, с успехом можно использовать для иммунохимического определения сравнительно больших концентраций веществ (порядка мкМ).

Реализация ИФАФС возможна при соблюдении двух важнейших условий. Во-первых, фермент должен с достаточной скоростью превращать конъюгат флуорогенного субстрата с определяемым лигандом в флуоресцирующие продукты. Во-вторых, этот конъюгат после присоединения к нему антител против лиганда уже не должен служить субстратом фермента. Следовательно, связанный с антителами конъюгат не должен под действием фермента превращаться в флуоресцирующие продукты. Если оба эти условия выполнены, то почти наверняка удастся создать удобный вариант ИФАФС.

Результаты, полученные при определении лекарственных препаратов и иммуноглобулинов, показывают, что точность, аналитическое обнаружение и достоверность анализа укладываются в обычные для иммунохимических методов рамки (табл. 6-1—6-4).

Предложены индикаторные полоски для определения теофиллина в сыворотке методом ИФАФС (Walter et al., 1983). Чтобы их изготовить, все реагенты, необходимые для ИФАФС, следует нанести на бумагу и высушить. Индикаторные полоски позволяют при подходящем разбавлении образцов выполнять иммуноанализ в одну стадию. Разработаны два варианта твердофазного ИФАФС. Они основаны на: 1) конкуренции между меченым и немеченым лигандом за связывание; 2) замещении меченого лиганда, связавшегося с антителами, немеченым лигандом. Идея замещения была использована в надежном и высокочувствительном методе радиоиммунологического определения T_4, включающем только одну стадию (Weetall, Odstrchel, 1976). Индикаторные полоски для конкурентного варианта твердофазного анализа получают в результате двукратного пропитывания бумаги. Первая пропитывающая смесь представляет собой раствор специфических антител и β-галактозидазы в буфере. Вторая пропитывающая смесь состоит из ацетона, в котором растворен конъюгат [флуорогенный субстрат — определяемый лиганд]. После первого пропитывания бумагу высушивают при 50 °С. В методе замещения раствор, содержащий конъюгат флуорогенного субстрата с определяемым лигандом, сначала инкубируют 15 мин с антителами к лиганду и затем

добавляют фермент. Еще через 15 мин раствор наносят на бумагу и сушат ее при 50 °С в течение 15 мин.

При выполнении анализа по любому из этих двух вариантов на индикаторную полоску наносят до 70 мкл разбавленного образца и регистрируют увеличение флуоресценции за определенный промежуток времени (3—15 мин). Интенсивность флуоресценции растет с увеличением концентрации определяемого лиганда.

По точности и достоверности твердофазный ИФАФС соизмерим с ИФАФС в растворе (Greenquist et al., 1981; Walter et al., 1983) (табл. 6-1 и 6-4).

Отметим, что японские исследователи упростили твердофазный ИФАФС благодаря использованию многослойного индикаторного фильтра с иммобилизованными реагентами (Terumo Corgoration of Japan, 1983; см. японский патент № 58, 150, 861, «Иммуноанализ лекарственных препаратов» и гл. 11 этой книги).

Ниже перечислены основные недостатки метода ИФАФС.

1) Спектральные характеристики флуоресцирующего соединения триамтерена (6-фенил-2,4,7-триаминоптеридина), применяемого в качестве мочегонного средства, сходны со спектральными характеристиками производных умбеллиферона. Следовательно, при контроле содержания этого препарата в сыворотке пациентов с помощью ИФАФС можно получить завышенные данные (инструкция по определению гентамицина методом ИФАФС; Ames Product, 1983). 2) Для приготовления конъюгата [флуорогенный субстрат — определяемый лиганд] необходим чрезвычайно чистый лиганд или его производное. Если в случае лекарственных веществ и гаптенов это требование не вызывает затруднений, то очистка высокомолекулярных лигандов или антигенов бывает сложной и дорогостоящей. Трудности усугубляются, когда антиген малодоступен. Использование неочищенных лигандов для получения флуорогенных конъюгатов может привести к высокой фоновой флуоресценции, так как меченые примеси не распознаются антителами и служат флуорогенными субстратами, из которых образуются флуоресцирующие продукты. Следовательно, при работе с загрязненными конъюгатами снижается чувствительность анализа. 3) Тушение флуоресценции 3-карбоэтокси-7-гидроксикумарина ковалентно связанным производным лиганда может существенно уменьшить чувствительность анализа. Для решения этой проблемы определяемый лиганд присоединяют к участку, который после ферментативного гидролиза не входит в состав флуоресцирующего продукта. Таким образом флуоресцирующие продукты защищают от тушения, которое может быть вызвано определяемым лигандом. Например, производное теофиллина (Тео) ковалентно связывают с остатком аденина в флавинадениндинуклеотиде (FAD) и

получают конъюгат [Тео—FAD] (Li, Burd, 1981). Этот конъюгат представляет собой флуорогенный субстрат FAD-пирофосфатазы. При ферментативном гидролизе Тео—FAD образуются конъюгат [теофиллин—аденозинмонофосфат; (Тео—AMP)] и флавинмононуклеотид (FMN). Однако гидролиз не происходит, если конъюгат [Тео—FAD] связан с антителами к теофиллину. Интенсивность флуоресценции изоаллоксазиновой группы в FMN примерно в 9 раз выше, чем в FAD. Тушение флуоресценции изоаллоксазинового остатка в FAD обусловлено внутримолекулярным контактом изоаллоксазинового кольца с адениновым кольцом AMP. На основе системы, состоящей из Тео—FAD, антител к теофиллину и FAD-пирофосфатазы, был разработан метод ИФАФС для теофиллина. 4) В отличие от большинства методов иммуноферментного анализа (Ngo, Lenhoff, 1982), где меткой служит фермент, в ИФАФС роль метки играет субстрат, т. е. в данном случае не используется ферментативное усиление сигнала. По этой причине в качестве метки применяют не хромогенный, а флуорогенный субстрат. Фермент в ИФАФС лишь помогает установить соотношение между связанным с антителами и несвязанным конъюгатом [флуорогенный субстрат—определяемый лиганд]. Чувствительность метода ИФАФС, лишенного усиливающего действия фермента, ограничена количеством конъюгата [флуорогенный субстрат — определяемый лиганд]. В свою очередь концентрация конъюгата зависит от концентрации лиганда в образце.

Примечание. Рис. 6-7—6-15 перепечатаны из оригинальных публикаций с разрешения издательств.

Литература

Benovic J. L., Cary L. C., Li T. M., Hatch R. P., Burd J. F. (1982). Substrate-labeled fluorescent immunoassay for caffeine in human serum, Clin. Chem., **28**, 1666.

Boguslaski R. C., Li T. M., Benovic J. L., Ngo T. T., Burd J. F., Carrico R. C., 1980. Substrate labeled homogeneous fluorescent immunoassays for haptens and proteins. In: Immunoassays: Clinical Laboratory Techniques for the 1980's, R. M. Nakamura, W. R. Dito, E. S. Tucker III, eds., Alan Liss, New York, pp. 45—64.

Burd J. F., Wong R. C., Feeney J. E., Carrico R. J., Boguslaski R. C. (1977). Homogeneous reactant labeled fluorescent immunoassay for therapeutic drugs exemplified by gentamicin determination in human serum, Clin. Chem., **23**, 1402—1408.

Burd J. F., Carrico R. J., Kramer H. M., Denning C. E., 1978. Homogeneous substrate-labeled fluorescent immunoassay for determining tobramycin concentrations in human serum. In: Enzyme Labelled Immunoassay of Hormones and Drugs, S. B. Pal, ed., Walter de Gruyter and Company, Berlin-New York, pp. 387—403.

Burd J. F., 1981. The homogeneous substrate-labeled fluorescent immunoassay. In: Methods in Enzymology, J. J. Langone and H. V. Vunakis, eds., Academic Press, New York, Vol. 74, pp. 79—87.

Cope A. C., Hofmann C. M., Wyckoff C., Hardenbergh E. (1941). Condensation reactions. II. Alkylidene cyanoacetic and malonic esters, J. Am. Chem. Soc., **63**, 3452.

Csiszar L., Li T. M., Benovic J. L., Buckler R. T., Burd J. F. (1981). Substrate-labeled fluorescent immunoassay for quinidine, Clin. Chem., **27**, 1087.
de Castro A. F., Lam C. T., Place J., Parker D., Patel C. (1984). Kanamycin concentration in serum using a substrate-labeled fluorescent immunoassay, Clin. Chem., **30**, 1027.
Feinstein H., Hovav H., Fridlender B., Inbar D., Buckler R. T. (1982). Substrate-labeled fluorescent immunoassay for valproic acid, Clin. Chem., **28**, 1665.
Greenquist A. C., Walter B., Li T. M. (1981). Homogeneous fluorescent immunoassay with dry reagents, Clin. Chem., **27**, 1614—1617.
Johnson P. K., Messenger L. J., Krausz L. M., Buckler R. T., Burd (1981). Substrate-labeled fluorescent immunoassay for primidone, Clin. Chem., **27**, 1093.
Krausz L. M., Hitz J. B., Buckler R. T., Burd J. F. (1980). Substrate-labeled fluorescent immunoassay for phenobarbital, Ther Drug Monit., **2**, 261—272.
Leaback D. H. (1965). Preparation of methylumbellifery-β-galactoside, Clin. Chim. Acta, **12**, 658.
Li T. M., Benovic J. L., Buckler R. T., Burd J. F. (1981). Homogeneous substrate-labeled fluorescent immunoassay for theophylline, Clin. Chem., **27**, 22—26.
Li T. M., Burd J. F. (1981). Enzymic hydrolysis of intramolecular complexes for monitoring theophylline in homogeneous competitive protein-binding reactions, Biochem. Biophys. Res. Commun., **31**, 1157—1165.
Li T. M., Miller J. E., Ward F. E., Burd J. F. (1982). Homogeneous substrate-labeled fluorescent immunoassay for carbamazepine, Epilepsia, **23**, 391—398.
Lima J. J., Shield B. J., Howell L. H., Mackichan J. J. (1984). Evaluation of fluorescence immunoassay for total and unbound serum concentrations of disopyramide, Ther Drug Monit., **6**, 203—210.
Ngo T. T., Carrico R. J., Boguslaski R. C., Burd J. F. (1981). Homogeneous substrate-labeled fluorescent immunoassay for IgG in human serum, J. Immunolog. Methods, **42**, 93—104.
Ngo T. T., Lenhoff H. M. (1981). Recent advances in homogeneous and separation-free enzyme immunoassays, Applied Biochem. Biotechnol., **6**, 53—64.
Ngo T. T., Lenhoff H. M. (1982). Enzymes as versatile labels and signal amplifiers for monitoring immunochemical reactions, Mol. Cell. Biochem., **44**, 3—12.
Pahuski E. E., Hixson C. S., Petrozolin A. K., Hatch R. P., Li T. M. (1982). Homogeneous substrate-labeled fluorescent immunoassay (SLFIA) for ethosuximide in human serum, Clin. Chem., **28**, 1664.
Pahuski E. E., Manzuk D. M., Maurer J. L., Li T. M. (1983). Total automation of the SLFIA's for ethosuximide and valproic acid, Clin. Chem., **29**, 1236.
Place J. D., Thompson S. G. (1983). Substrate-labeled fluorescent immunoassay for measuring dibekacin concentrations in serum and plasma, Antimicrob Agents Chemother., **24**, 240—245.
Terumo Corp., 1983. Sept. 7, Japan Patent No. 58, 150, 861, Immunoassay for the determination of drugs.
Thompson S. G., Burd J. F. (1980). Substrate-labeled fluorescent immunoassay for amikacin in human serum, Antimicrob. Agents Chemother., **18**, 264—268.
Walter B., Greenquist A. C., Howard III, W. E. (1983). Solid-phase strips for detection of therapeutic drugs in serum by substrate-labeled fluorescent immunoassay, Anal. Chem., **55**, 873—878.
Weetall H. H., Odstrchel G. (1976). A biased solid-phase radioimmunoassay for thyroxine using T4-[125]I antibodies, J. Solid-phase Biochem., **1**, 241—245.
Wong R. C., Burd J. F., Carrico R. J., Buckler R. T., Thoma J., Boguslaski R. C. (1979). Substrate-labeled fluorescent immunoassay for phenytoin in human serum, Clin. Chem., **25**, 686—691.
Wong R. C., George R., Yeung R., Burd J. F. (1980). A comparison of serum phenitoin determination by the substrate-labeled fluorescent immunoassay with gas chromatography, liquid chromatography, radioimmunoassay and 'EMIT', Clin. Chim. Acta, **100**, 65—69.
Worah D., Yeung K. K., Ward F. E., Carrico R. J. (1981). A homogeneous fluorescent immunoassay for human immunoglobulin M., Clin. Chem., **27**, 673—677.

Глава 7

Иммуноанализ на основе конформационных ограничений, создаваемых для фермент-зависимой метки антителами

Т. Т. Нго, Х. М. Ленхофф

Введение

В этой главе описан метод иммуноферментного анализа без разделения компонентов, основанный на способности специфических антител против лиганда ограничивать конформационную подвижность связанного с ним апофермента. В результате такого воздействия апофермент теряет возможность сворачиваться в каталитически активную конформацию.

Модельная система (рис. 7-1) была построена с применением в качестве голофермента глюкозооксидазы (ГО), которая функционирует при наличии простетической группы — флавинадениндинуклеотида (FAD). В рассматриваемом варианте иммуноанализа прежде всего необходимо ковалентно связать фермент с определяемым лигандом (стадия 1). Мы метили фермент 2,4-динитрофенильными группами, обрабатывая его 2,4-динитрофторбензолом. При этом модифицированный фермент сохранял активность, что и требовалось для анализа.

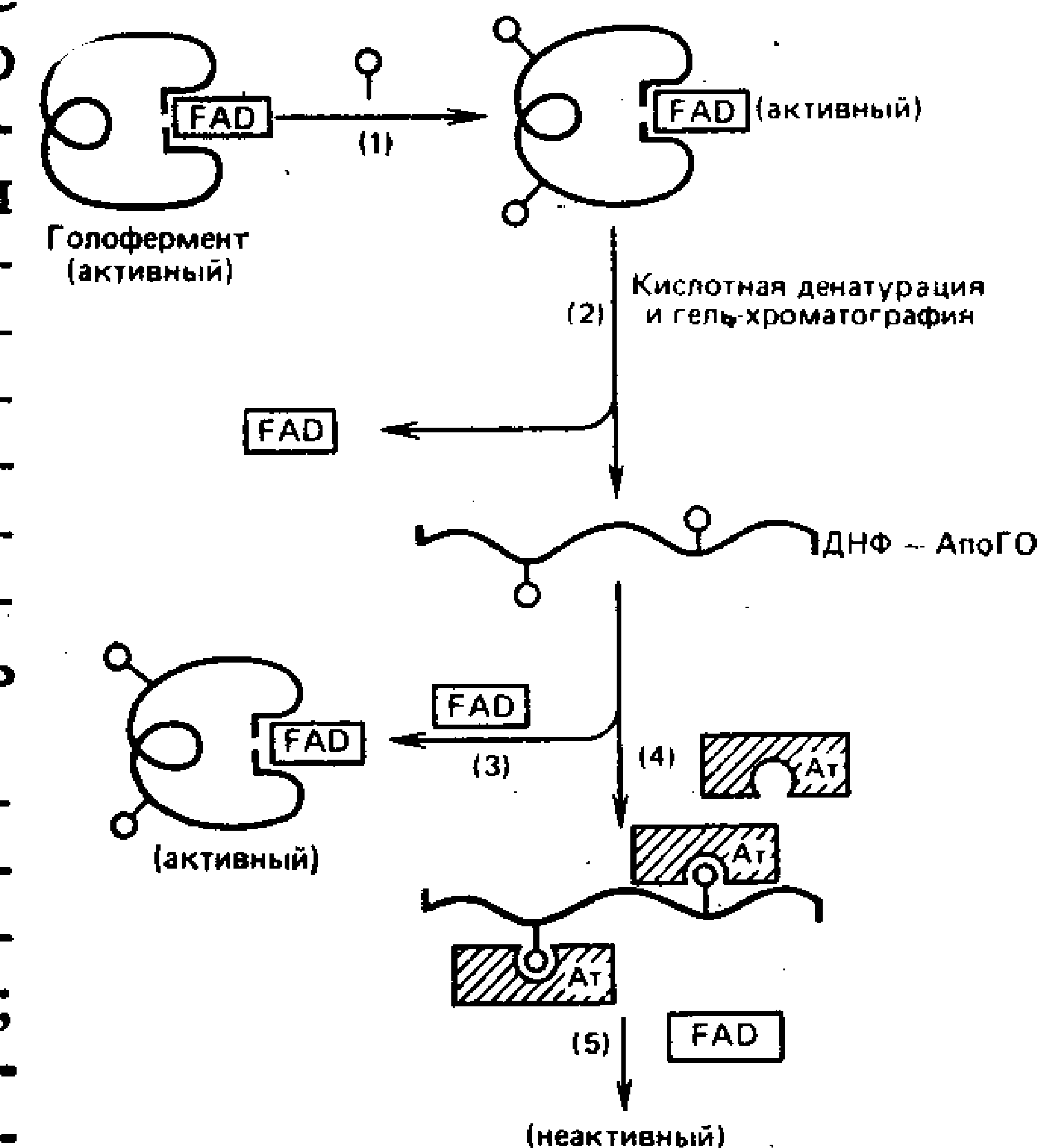


Рис. 7-1. Принцип и экспериментальные стадии разработки ИФАКО. Голофермент — глюкозооксидаза; или ДНФ — 2,4-динитрофенильные группы; ДНФ—АпоГО — денатурированная апоглюкозооксидаза, меченная 2,4-динитрофенильными группами; Ат — антитела к ДНФ-группам.

Далее на стадии 2 мы удаляли FAD из меченого фермента методом кислотной денатурации (Morris et al., 1981; Ngo, Lenhoff, 1980a) и с помощью гель-фильтрации получали меченую апоглюкозооксидазу. Апофермент, содержавший метку, не обладал активностью и мог вступать в одну из следующих двух реакций. Во-первых, он мог присоединять FAD, в результате чего регенерировался активный фермент (стадия 3). Во-вто-

рых, конъюгированный с апоферментом лиганд мог связываться с антителами к лиганду (стадия 4) с образованием комплекса [антитело—меченый апофермент], не способного к восстановлению каталитически активной формы фермента при добавлении FAD (стадия 5). Вероятно, антитела ограничивают подвижность полипептидной цепи меченого апофермента и не дают ей свернуться в каталитически активную конформацию, которая в отсутствие антител образуется на стадии 3. Таким образом, мы разработали метод иммуноферментного анализа на основе конформационных ограничений создаваемых для меченого апофермента антителами (ИФАКО). Как вытекает из сказанного, для разработки ИФАКО необходимо было показать, что: а) при соединении апоглюкозооксидазы (АпоГО), меченной динитрофенильными группами (ДНФ), с FAD восстанавливается ферментативная активность; б) эта активность прямо пропорциональна концентрации FAD-связывающих участков апоглюкозооксидазы; в) добавление иммунной сыворотки, содержащей антитела к ДНФ (анти-ДНФ), предотвращает образование активной глюкозооксидазы из ДНФ—АпоГО и FAD; г) свободный лиганд, содержащий ДНФ-группы, способен конкурировать с ДНФ—АпоГО за анти-ДНФ. Результаты поставленных опытов и приведенная полная схема реакций для модельной системы показывают, что идея метода ИФАКО практически осуществима в лаборатории.

Материалы и методы

Реактивы: 2,4-динитрофторбензол, флавинадениндинуклеотид, пероксидаза хрена (ПХ) и N-2,4-динитрофенил-ε-аминокапроновая кислота (ДНФ-АКК) (Sigma Chemical Co.); 3-диметиламинобензойная кислота (ДМАБК) и 3-метил-2-бензотиазолинонгидразон (МБТГ) (Aldrich Chemical Co.); кроличья антисыворотка против ДНФ и высокоочищенная глюкозооксидаза *Aspergillus niger* (Miles Labs, Inc.).

Глюкозооксидазу, меченную 2,4-динитрофенильными группами (ДНФ), получали по реакции между глюкозооксидазой и 2,4-динитрофторбензолом (Johnson et al., 1980).

FAD удаляли из меченой гологлюкозооксидазы методом кислотной денатурации, обрабатывая меченый фермент серной кислотой (Morris et al., 1981; Ngo, Lenhoff, 1980a).

Активность глюкозооксидазы определяли по сопряженной реакции, катализируемой пероксидазой. В качестве субстратов использовали ДМАБК, МБТГ и H_2O_2 (Ngo, Lenhoff, 1980b).

Результаты

Обработка серной кислотой гологлюкозооксидазы, меченной ДНФ-группами, приводит к диссоциации голофермента (Ngo,

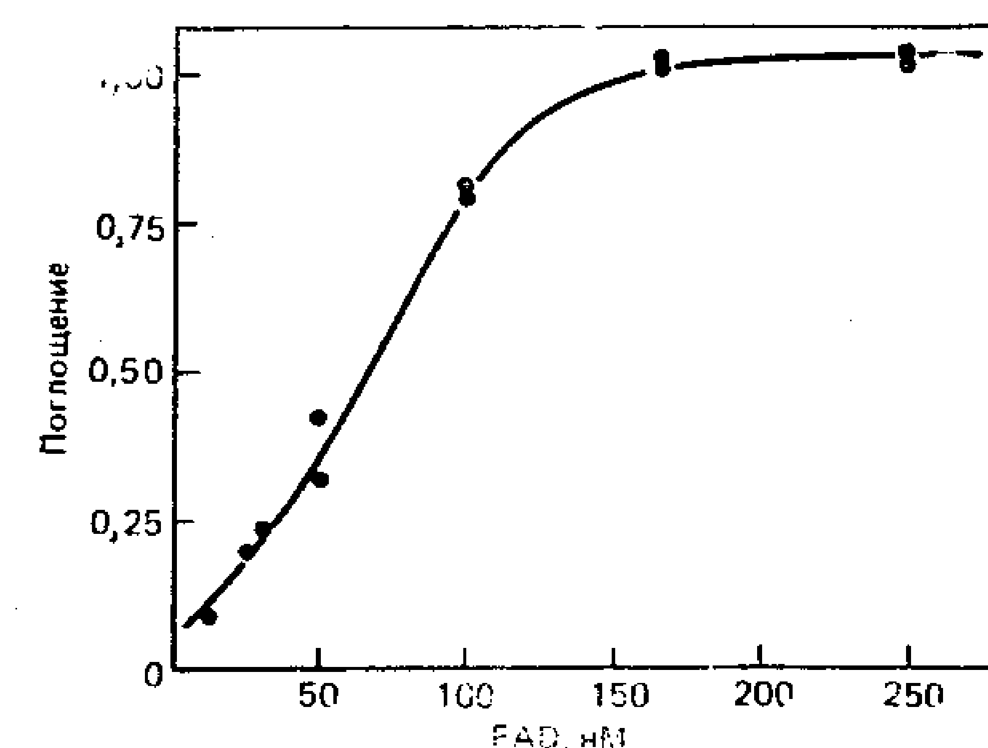


Рис. 7-2. Восстановление активной глюкозооксидазы из ДНФ—АпоГО и FAD. Растворы (10 мкл), приготовленные на 0,1 М натрий-фосфатном буфере, pH 6,5, и содержащие FAD в разных концентрациях (25—500 нМ), смешивали с 10 мкл раствора ДНФ—АпоГО и инкубировали 30 мин при 25 °C. К каждому из полученных растворов добавляли смесь для определения активности (4 мл), инкубировали при 25 °C еще 5 мин и измеряли поглощение при 590 нм. Смесь для определения активности, приготовленная на 0,1 М натрий-фосфатном буфере, pH 6,5, содержала 75 мМ D-глюкозу, 3 мМ ДМАБК, 0,075 мМ МБТГ, 31,25 нМ пероксидазу хрена и 37,5 мМ NaCl.

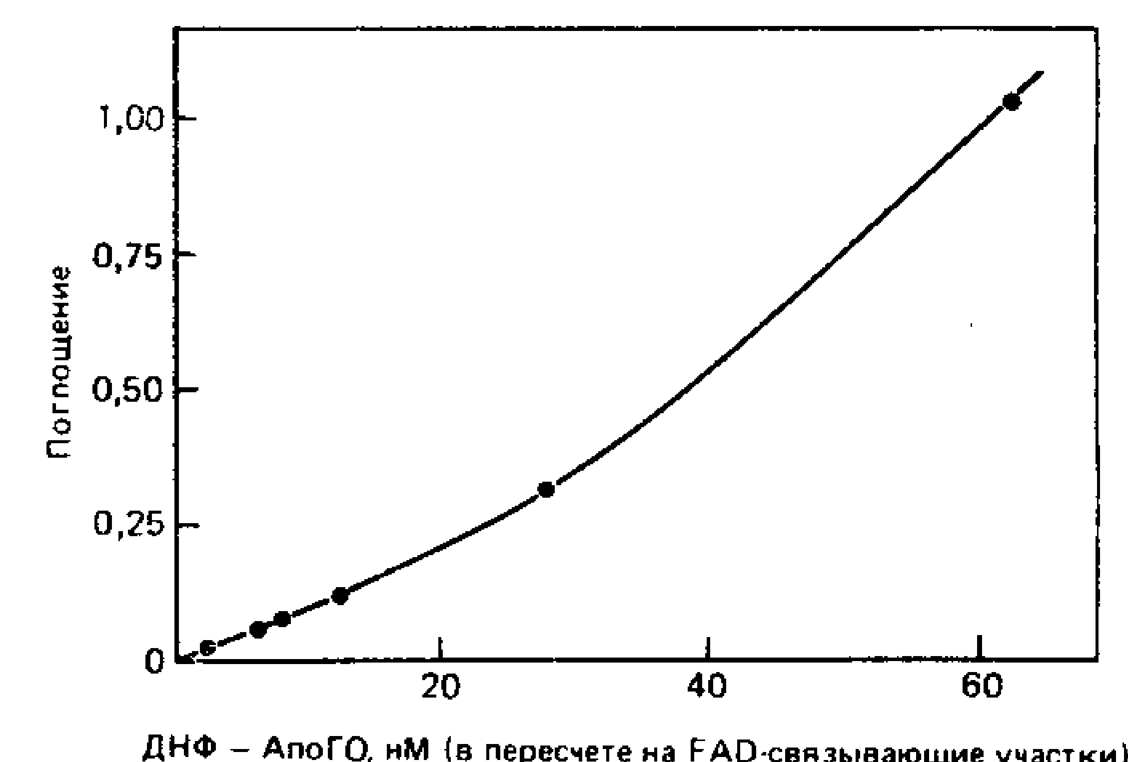


Рис. 7-3. Зависимость регенерируемой активности глюкозооксидазы от концентрации ДНФ—АпоГО. К 10 мл раствора с разным содержанием ДНФ—АпоГО, выраженным через концентрацию FAD-связывающих участков, прибавляли 10 мкл 1 мкМ FAD (насыщающая концентрация, см. рис. 7-2) и инкубировали 15 мин при 25 °C; затем добавляли 4 мл смеси для определения активности (состав см. в подписи к рис. 7-2), инкубировали 15 мин при 25 °C и измеряли поглощение при 590 нм.

Lenhoff, 1980a; Morris et al., 1981); высвобождающийся при этом FAD отделяли от ДНФ-АпоГО методом гель-фильтрации. Каталитическую активность денатурированной ДНФ—АпоГО восстанавливали инкубацией с FAD при pH ~7 (Johnson et al., 1980). При повышении концентрации FAD наблюдался рост глюкозооксидазной активности до некоторого максимального значения (рис. 7-2). Из этих опытов мы рассчитали концентрацию FAD-связывающих участков. Максимальная регенирируемая активность глюкозооксидазы прямо пропорциональна этой концентрации (рис. 7-3).

Если к растворам с одной и той же концентрацией денатурированной в кислоте ДНФ—АпоГО прибавить разные количества кроличьей антисыворотки против ДНФ и инкубировать 30 мин при 25 °C, а затем добавить избыток FAD, то восстановленная глюкозооксидазная активность будет уменьшаться с увеличением количества сыворотки (рис. 7-4). Вместе с тем при добавлении антисыворотки против ДНФ к меченой ГолоГО, которую предварительно не денатурировали серной кислотой,

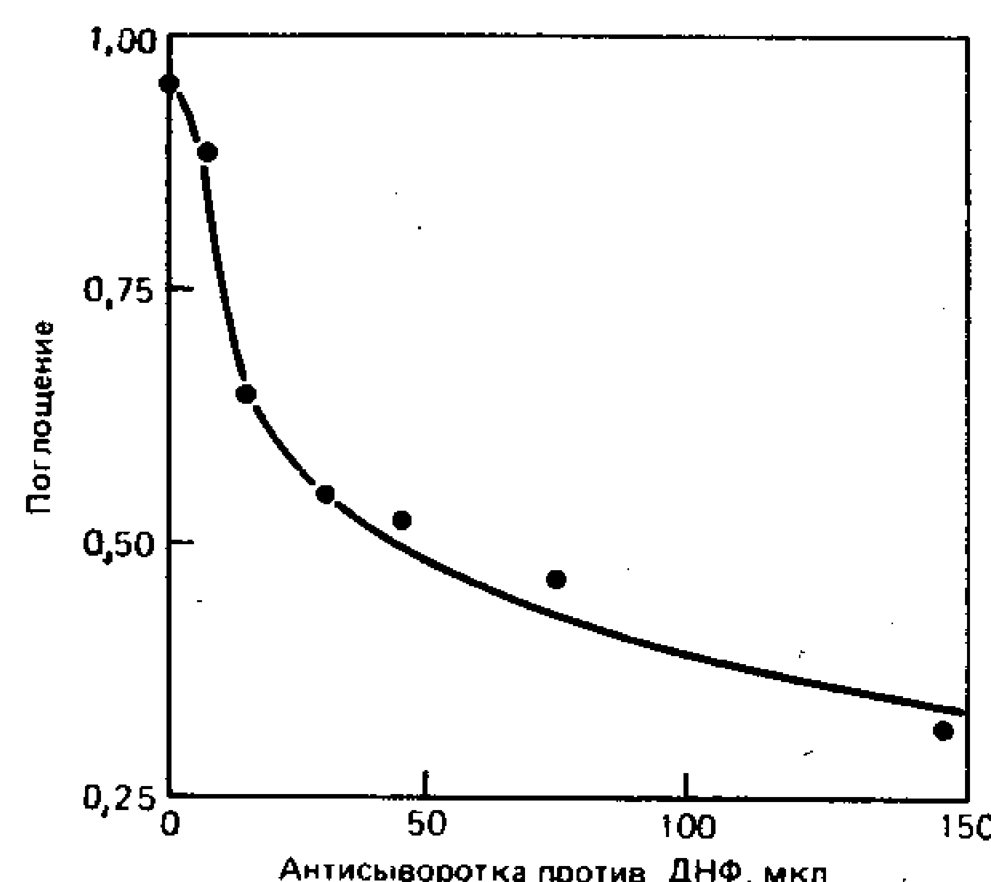


Рис. 7-4. Подавление восстановления активной глюкозооксидазы из ДНФ—АпоГО и FAD антисывороткой к ДНФ. К 50 мкл ДНФ—АпоГО (25 нМ относительно FAD-связывающих участков) прибавляли различные количества антисыворотки против ДНФ. Объемы растворов доводили до 200 мкл с помощью 0,1 М натрий-фосфатного буфера, pH 6,5, и инкубировали 30 мин при 25 °С. Добавляли 100 мкл 10 мкМ FAD, инкубировали еще 30 мин при 25 °С и измеряли активность глюкозооксидазы (см. подпись к рис. 7-2).

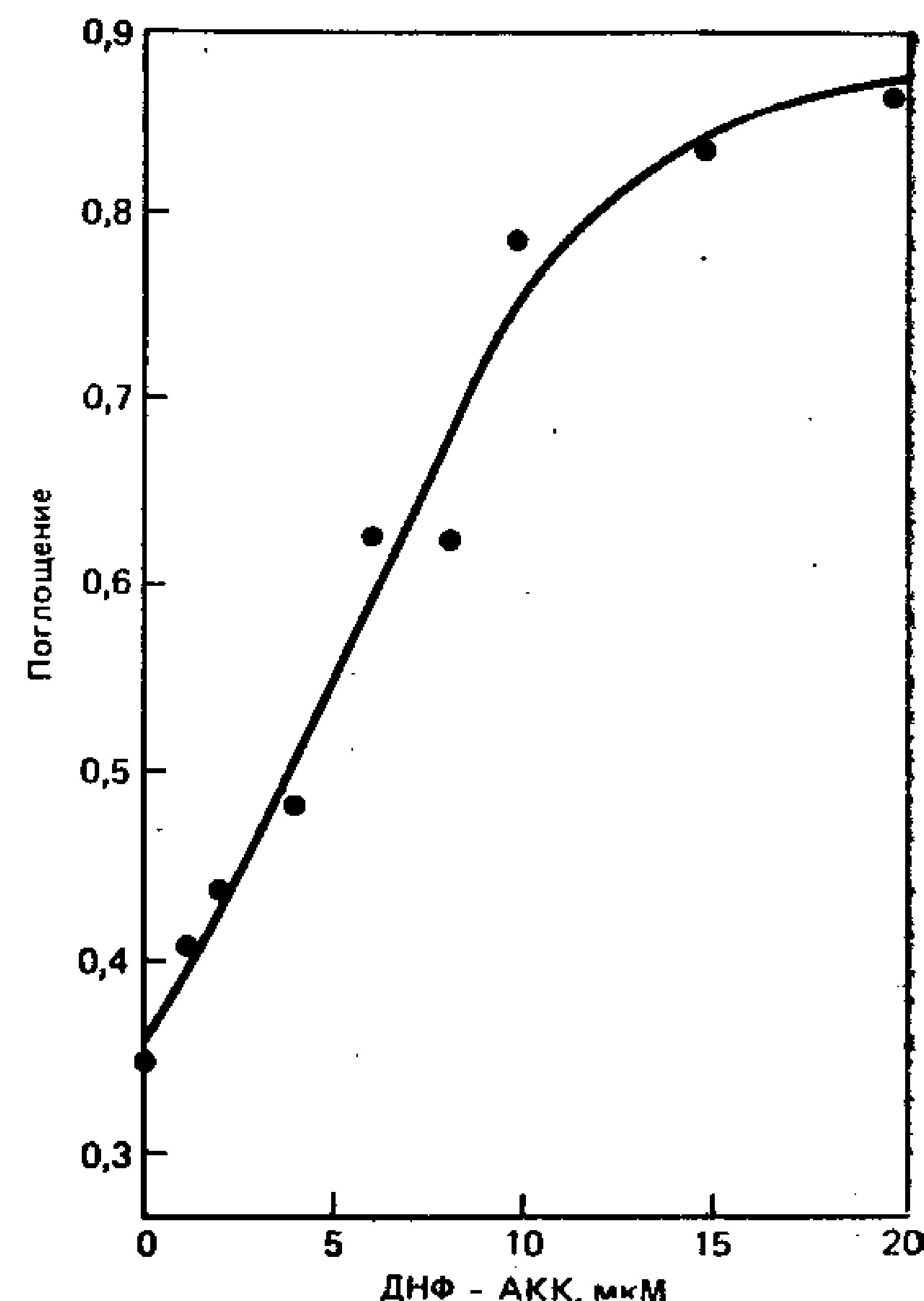


Рис. 7.5. Калибровочная кривая для определения ДНФ-АКК методом ИФАКО. К 50 мкл раствора с разным содержанием ДНФ-АКК добавляли 50 мкл раствора с постоянной концентрацией ДНФ—АпоГО (25 нМ относительно FAD-связывающих участков). К каждой из полученных смесей добавляли 25 мкл антисыворотки против ДНФ и инкубировали 30 мин при 25 °С. Затем прибавляли 100 мкл 100 нМ FAD и инкубировали 15 мин при 25 °С. После добавления 4 мл смеси для определения активности пробы инкубировали еще 15 мин при 25 °С и измеряли в них поглощение.

или к меченой ГолоГО, восстановленной из ДНФ—АпоГО и FAD, мы не наблюдали изменения ферментативной активности.

К растворам с различным содержанием ДНФ-АКК при перемешивании добавляли следующие вещества: одно и то же количество ДНФ—АпоГО и антисыворотки против ДНФ, избыток FAD и избыток смеси для определения фермента. Было найдено, что ферментативная активность повышается с ростом концентрации ДНФ-АКК (рис. 7-5). По-видимому, ДНФ-АКК конкурирует с ДНФ—АпоГО за антитела к ДНФ и поэтому с ДНФ—АпоГО соединяется меньше антител. В результате увеличивается число свободных, несвязанных молекул ДНФ—

АпоГО, которые сворачиваются в правильную конформацию, необходимую для присоединения FAD и восстановления ферментативной активности.

Обсуждение

В иммуноферментном анализе без разделения компонентов антитела к лиганду обычно применяют для модулирования активности следующих ковалентных конъюгатов: 1) [лиганд—фермент] (Rubenstein et al., 1972); 2) [лиганд—субстрат] или [лиганд—простетическая группа] (Burd et al., 1977; Ngo et al., 1981; Morris et al., 1981); 3) [лиганд—ингибитор фермента] (Ngo, Lenhoff, 1980c).

В этой главе мы рассмотрели новый метод иммуноферментного анализа без разделения компонентов. Этот метод, названный ИФАКО, основан на способности специфических антител против лиганда ограничивать конформационную гибкость связанного с лигандом белка. В условиях ограниченной подвижности белок не может свернуться в каталитически активную конформацию.

Идея и экспериментальные стадии разработки ИФАКО обсуждаются во «Введении» и проиллюстрированы на рис. 7-1.

Все реакции, протекающие при выполнении анализа, суммированы на рис. 7-6. Успех создания ИФАКО зависел от результатов, представленных на рис. 7-2—7-5. Как видно из рис. 7-2 и 7-3, в сильнокислой среде меченая ДНФ—ГолоГО денатурирует и распадается на FAD и ДНФ—АпоГО. Ни FAD, ни ДНФ—АпоГО не обладают заметной ферментативной активностью. Однако связывание FAD с ДНФ—АпоГО при pH ~7 приводит к восстановлению ферментативной активности. Если ДНФ—АпоГО перед добавлением FAD инкубировать с антисывороткой против ДНФ, то восстановление активности предотвращается (рис. 7-4). Добавление к ДНФ—АпоГО свободных ДНФ-групп в виде ДНФ-АКК снимает ингибирующее действие сыворотки против ДНФ и сопровождается повышением ферментативной активности (рис. 7-5).

Итак, согласно рис. 7-6, в отсутствие определяемого лиганда (ДНФ-АКК) реакция *I* не протекает, а ДНФ—АпоГО и антитела (Ат) соединяются по реакции *II*; в результате лишь малая часть ДНФ—АпоГО может присоединить

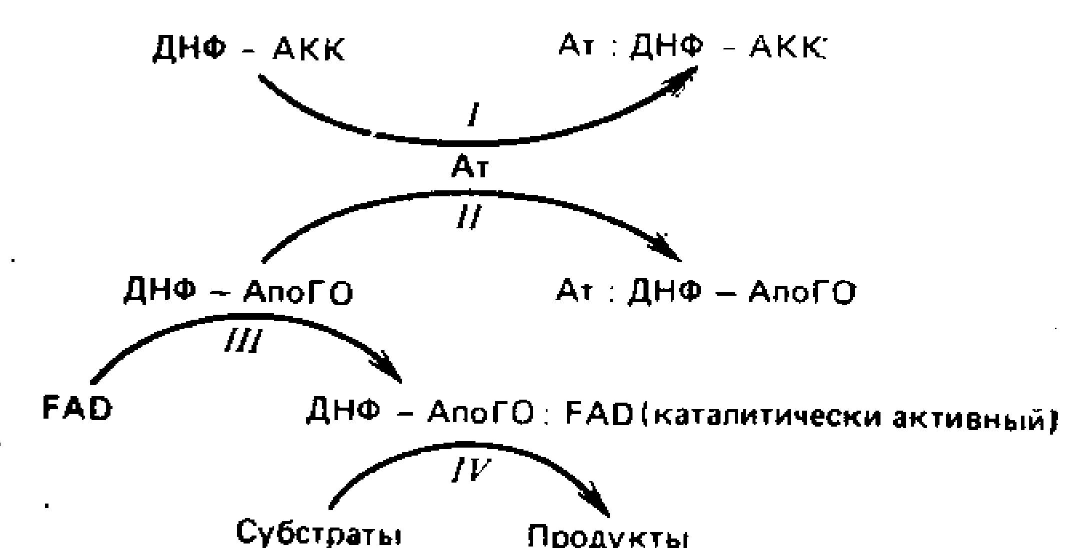


Рис. 7-6. Принцип ИФАКО на примере определения ДНФ-АКК. ДНФ-АКК — 2,4-динитрофенил-ε-аминокапроновая кислота. Остальные обозначения те же, что на рис. 7-1.

FAD с образованием каталитически активного комплекса ДНФ—АпоГО:FAD (реакция *III*). Таким образом, количество продуктов, выделяющихся в реакции *IV*, пропорционально количеству определяемого вещества. Данные, приведенные на рис. 7-4—7-5, свидетельствуют о появлении нового метода иммуноферментного анализа без разделения компонентов (гомогенного метода).

Литература

Burd J. F., Wong R. C., Feeney J. E., Carrico R. J., Boguslaski R. C. (1977). Homogeneous reactant-labeled fluorescent immunoassay for theraupetic drugs exemplified by gentamicin determination in human serum, Clin. Chem., **23**, 1402—1408.

Johnson Jr., R. B., Libby R. M., Nakamura R. M. (1980). Comparison of glucose oxidase and peroxidase as labels for antibody in enzyme-linked immunosorbent assay, J. Immunoassay, **1**, 27—37.

Morris D. L., Ellis P. B., Carrico R. J., Yeager F. M., Schroeder H. R., Albarella J. P., Boguslaski R. C., Hornby W. E., Rawson D. (1981). Flavin adenine dinucleotide as a label in homogeneous colorimetric immunoassays, Anal. Chem., **53**, 658—665.

Ngo T. T., Lenhoff H. M. (1980a). Amperometric determination of picomolar levels of flavin adenine dinucleotide by cyclic oxidation-reduction in apo-glucose oxidase system, Anal. Letters, **13**, 1157—1165.

Ngo T. T., Lenhoff H. M. (1980b). A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions, Anal. Biochem., **105**, 389—397.

Ngo T. T., Lenhoff H. M. (1980c). Enzyme modulators as tools for the development of homogeneous enzyme immunoassays, FEBS Letters, **116**, 285—288.

Ngo T. T., Lenhoff H. M. (1983). Antibody-induced conformational restriction as basis for new separation-free enzyme immunoassay, Biochem. Biophys. Res. Comm., **114**, 1097—1103.

Ngo T. T., Carrico R. J., Boguslaski R. C., Burd J. F. (1981). Homogeneneous substrate-labeled fluorescent immunoassay for IgG in human serum, J. Immunol. Methods, **42**, 93—103.

Rubenstein K. E., Schneider R. S., Ullman E. F. (1972). «Homogeneous» enzyme immunoassay: a new immunochemical technique, Biochem. Biophys. Res. Comm., **47**, 846—851.

Глава 8

Определение макромолекул с помощью иммуноферментного анализа без разделения компонентов

Я. Гиббонз

Введение

В Исследовательском институте Syva разработаны два типа гомогенных методов иммуноферментного анализа для высокомолекулярных веществ. Методы первого типа связаны с применением β-галактозидазы и макромолекулярного субстрата (Gibbons et al., 1980). Методы второго типа основаны на использовании «ферментных каналов» (Litman et al., 1980) с участием двух или большего числа ферментов. В этой главе мы рассмотрим принципы, особенности, ход выполнения и клинические приложения методов обоих типов.

О получении и характеристиках реагентов сообщалось в предыдущих публикациях, поэтому здесь мы ограничимся описанием методик анализов и обсуждением результатов.

Методы анализа с использованием β-галактозидазы и высокомолекулярного субстрата

Мы рассмотрим три метода анализа сывороточных белков: колориметрический иммуноанализ на основе ингибирования фермента (Gibbons et al., 1980); турбидиметрический иммунометрический анализ на основе активации фермента (Gibbons et al., 1981) и более чувствительный флуориметрический иммуноанализ на основе ингибирования фермента (Armenta et al., 1985).

Колориметрический иммуноанализ на основе ингибирования фермента

Очевидно, что при разработке гомогенного иммуноферментного анализа для определения макромолекул следует учитывать размеры антигена. Нельзя ожидать, что связывание антител с антигеном, меченным при помощи фермента, скажется на ферментативной активности по отношению к малому субстрату, так как массивный антиген не передает воздействия ферменту. Однако в случае крупного субстрата присоединение антител, вероятно, приведет к ингибированию в результате стерического

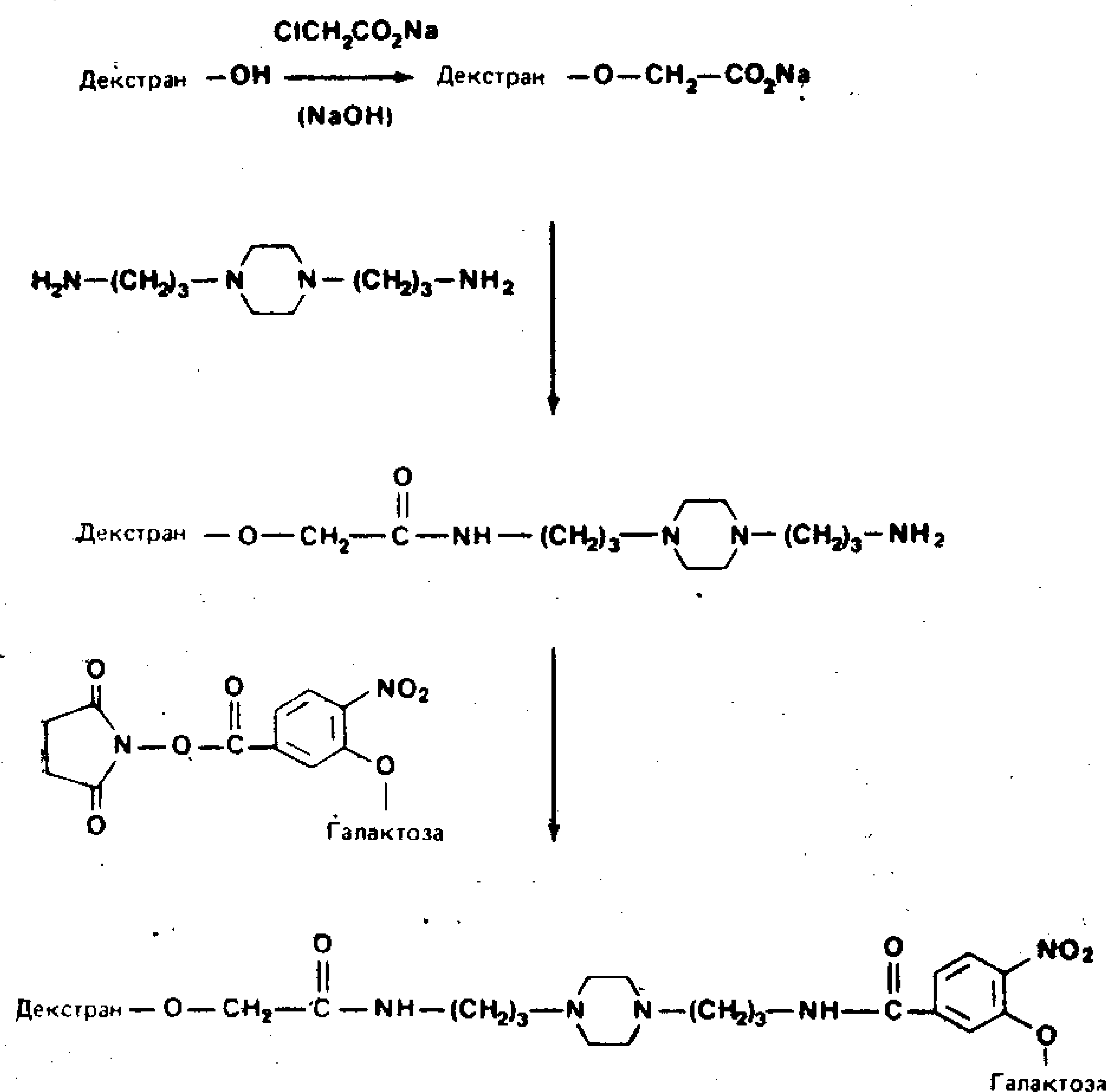


Рис. 8-1. Получение хромогенного высокомолекулярного субстрата для β-галактозидазы. Синтез проводили в водном растворе (Skold, 1981). Использовали декстраны со средней молекулярной массой от 40 000 до 180 000. Степень замещения составляла примерно один остаток галактозида на пять остатков глюкозы.

исключения субстрата. Это откроет путь к созданию иммуноанализа на основе ингибирования фермента.

Хотя макромолекулярные субстраты известны для многих ферментов, при выборе ферментной метки мы отдали предпочтение β-галактозидазе. Этот фермент из *E. coli* имеется в продаже, он устойчив, отличается большим числом оборотов при расщеплении хромогенных субстратов, удобных для анализа, его можно легко и без потери активности соединять с белками. Кроме того, в сыворотке человека не обнаружены ферменты, обладающие аналогичной активностью при тех же pH, что и β-галактозидаза, и способные помешать анализу.

Поскольку у β-галактозидазы нет доступных высокомолекулярных субстратов, такой субстрат был синтезирован присоединением к декстрану большого числа молекул *о*-нитрофенилгалактозида — хорошего хромогенного субстрата (Skold, 1981) (рис. 8.1). После оптимизации условий синтеза удалось получить превосходный субстрат, максимальная скорость расщепления которого была лишь вдвое меньше скорости расщепления исходного низкомолекулярного субстрата (Skold, Gibbons, неопубликованные данные).

Полученный макромолекулярный субстрат был использован для иммуноанализа сывороточных белков (Gibbons et al., 1980). Необходимые реагенты и принцип метода представлены на рис. 8-2.

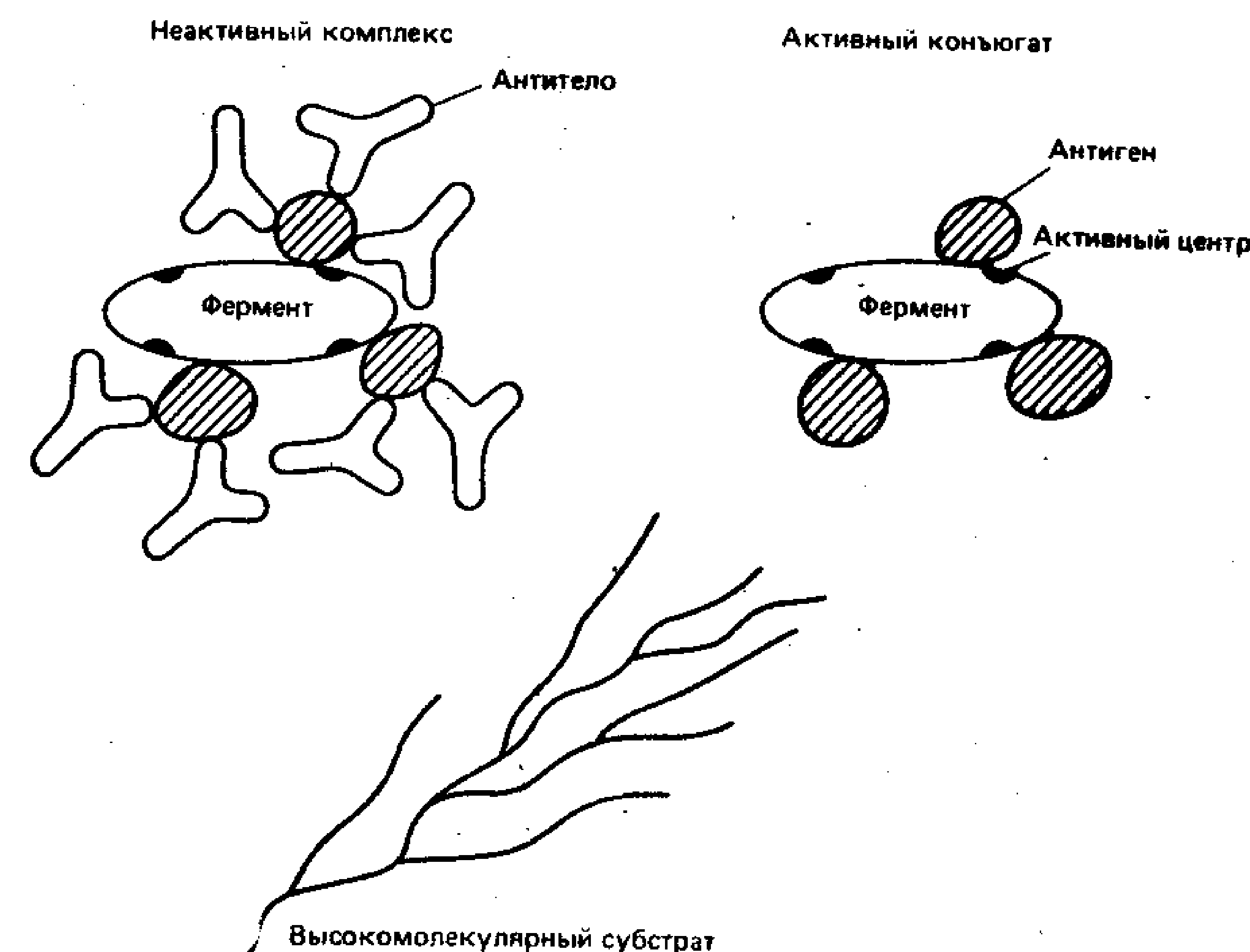


Рис. 8-2. Принцип колориметрического иммуноанализа на основе ингибирования фермента и необходимые реагенты. В конъюгате белкового антигена с β-галактозидазой с каждой молекулой фермента связано несколько молекул антигена (Gibbons et al., 1980). Высокомолекулярный субстрат (см. рис. 8-1) получают из декстрана — гибкого линейного разветвленного полимера, который легко связывается с активным центром фермента. Присоединение антител к антигену, меченному с помощью фермента, создает пространственные затруднения и ингибирует до 95% ферментативной активности. При выполнении иммуноанализа образец одновременно или последовательно инкубируют с антителами и меченым антигеном. Когда антиген из образца соединяется с антителами, уменьшается число антител, связывающихся с меченым антигеном и ингибирующих ферментную метку. Таким образом, ферментативная активность прямо пропорциональна концентрации антигена в образце.

Если приготовить смешанный реагент, содержащий макромолекулярный субстрат и антитела, то можно воспользоваться методикой экспрессного анализа с применением двух реагентов. На рис. 8-3 приведена такая методика для определения в сыворотке С-реактивного белка — чувствительного индикатора воспаления и некроза тканей (Pepys, 1981). Набор реагентов для этого варианта анализа имеется в продаже. Метод рассчи-

1. Разбавьте 8,3 мкл сыворотки 300 мкл буфера.
2. Добавьте 50 мкл реагента А и 250 мкл буфера.
3. Добавьте 50 мкл реагента Б и 250 мкл буфера.
4. Заполните проточную ячейку спектрофотометра, термостатируемую при 37 °С, и запишите изменение поглощения при 405 нм за 30 с (между 15-й и 45-й секундами) при длине оптического пути 1 см.

Реагент А: антитела против С-реактивного белка и хромогенный высокомолекулярный субстрат.

Реагент Б: С-реактивный белок, меченный β-галактозидазой.

Буфер: имидазол — HCl, pH 7,1.

Рис. 8-3. Методика определения С-реактивного белка в сыворотке с помощью колориметрического иммуноанализа на основе ингибирования фермента.

Таблица 8-1. Характеристики EMIT-анализа С-реактивного белка из сыворотки в сравнении с другими стандартными методами[1]

Метод	Число образцов	Коэффициент корреляции	Наклон линии регрессии	Отрезок, отсекаемый на оси координат, мг/дл
Радиальная иммунодиффузия	75	0,99	0,98	0,13
Нефелометрия	85	0,99	1,05	—0,08
«Ракетная» электроиммунодиффузия	70	0,96	1,03	—0,88

[1] Источник данных: информация, прилагаемая к набору для EMIT-анализа С-реактивного белка, декабрь 1982 г. Фирма «Syva», Пало-Альто.

тан на работу с автоматическим анализатором, но измерения можно выполнять и вручную. Как видно из табл. 8-1, обсуждаемый метод анализа С-реактивного белка по своим характеристикам сопоставим с другими стандартными методами. Область определяемых концентраций лежит в пределах 1—16 мг/дл. Точность внутри этой области составляет примерно 5—10%. Главное преимущество анализа на основе ингибирования фермента заключается в возможности применения автоматических анализаторов с обычными спектрофотометрическими детекторами.

Турбидиметрический иммуноанализ на основе активации фермента

Для получения реагента с ферментной меткой в описанном выше методе необходим высокоочищенный антиген. К сожалению, очистка и стабилизация сывороточных белков и других макромолекул, представляющих интерес для клиники, часто вызывают затруднения. Чтобы обойти их, Гиббонз и соавторы (Gibbons et al., 1981) видоизменили этот метод и сделали его иммунометрическим (т. е. методом с использованием меченых антител; ср. Miles, Hales, 1968). На рис. 8-4 показано, каким образом удалось этого добиться.

Прежде чем подробно обсудить разработанный подход, будет полезно рассмотреть модельный опыт, проведенный для изучения роли заряда в колориметрическом анализе на основе ингибирования фермента. β-Галактозидазу, связанную с IgG человека, титровали с помощью нативного анти-IgG или анти-IgG, в который вводили разное число сукцинильных групп для увеличения отрицательного заряда. После этого определяли ферментативную активность по расщеплению хромогенного высокомолекулярного субстрата. Как видно из рис. 8-5, немодифи-

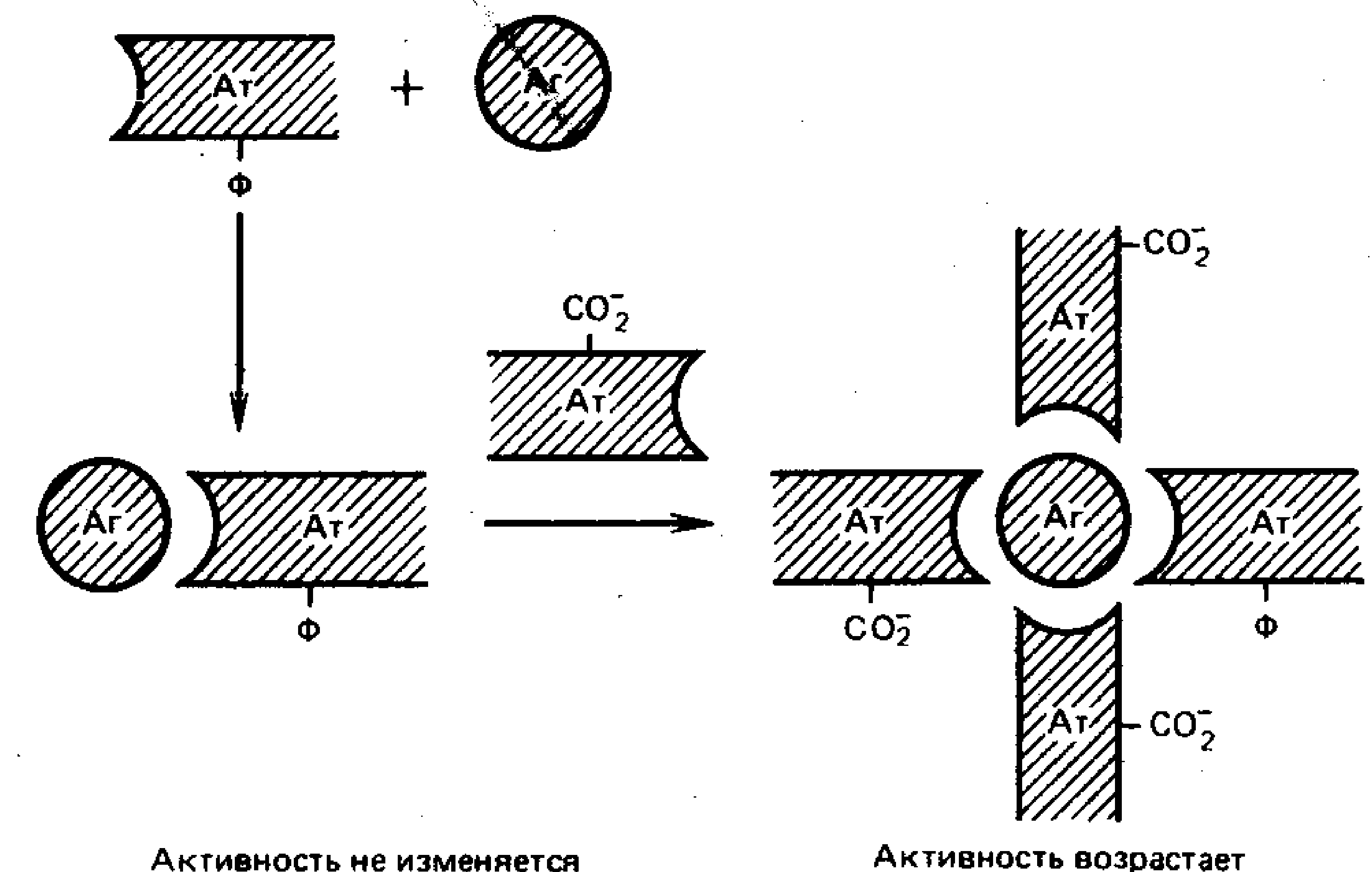


Рис. 8-4. Турбидиметрический анализ многовалентных антигенов, основанный на активировании фермента. Многовалентный антиген из образца последовательно реагирует с антителами, меченными β-галактозидазой, и модифицированными антителами, несущими большой отрицательный заряд (вследствие обработки янтарным ангидридом). В образующемся комплексе фермент окружен отрицательными зарядами. При анализе с помощью поликатионного макромолекулярного субстрата (см. рис. 8-1) ферментный конъюгат, входящий в состав комплекса, проявляет бо́льшую активность по сравнению со свободным конъюгатом или конъюгатом, связанным только с антигеном. Аг — антиген, Ат — антитело, Ф — фермент.

цированные антитела подавляли до 85% активности. Однако антитела с низким содержанием сукцинильных групп (24 группы на молекулу) не оказывали существенного влияния, а антитела с высоким содержанием сукцинильных групп (44 группы на молекулу) вызывали *рост* ферментативной активности. Ясно, что воздействие антител зависит от их заряда. Нативные антитела ингибируют ферментативную активность вследствие стерического исключения субстрата (это явление лежит в основе метода, описанного в предыдущем разделе). Активация антителами с большим отрицательным зарядом объясняется, по-видимому, двумя свойствами высокомолекулярного субстрата. Благодаря положительно заряженным группам, связывающим декстран с *о*-нитрофенилгалактозильными остатками, субстрат представляет собой поликатион. Кроме того, декстран обладает гибким молекулярным остовом. При наличии таких свойств электростатические взаимодействия позволяют преодолеть стерическое исключение, наблюдаемое в случае нативных антител.

Показано, что повышение активности обусловлено не увеличением числа оборотов субстрата, а изменением природы продукта (Gibbons et al., 1981). Когда отрицательно заряженные антитела присоединяются к меченному ферментом антигену, β-галактозидаза, оказавшаяся в окружении отрицательных за-

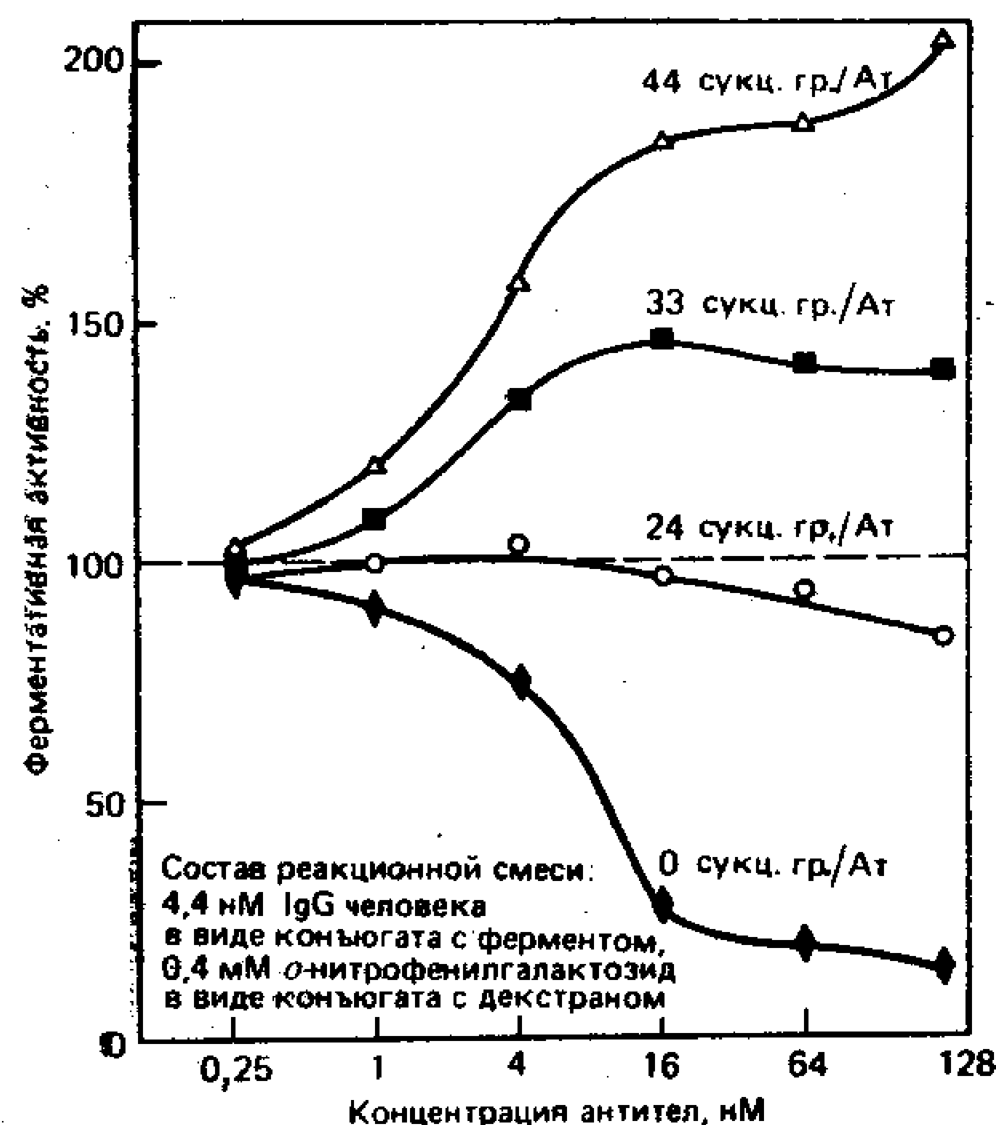


Рис. 8-5. Влияние нативных и отрицательно заряженных антител на активность конъюгата [антиген — фермент]. IgG человека (0,76 мкг), меченный β-галактозидазой (0,50 мкг), инкубировали в 0,1 мл буфера в течение 3 ч при комнатной температуре с антителами барана против IgG человека, содержащими указанное число сукцинильных групп. Затем измеряли ферментативную активность, для чего добавляли 0,4 мкмоль хромогенного высокомолекулярного субстрата (на основе декстрана с мол. массой 40 000), растворенного в 0,9 мл буфера, и регистрировали изменение поглощения при 420 нм за 30 с при 37 °С. Указана конечная концентрация антител. Реагенты, полученные по методике Гиббонза и др. (Gibbons et al., 1980; 1981), растворяли в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,0, содержащем 0,13 М NaCl, 5 мМ NaN_3, 1 мМ ацетат магния и кроличий сывороточный альбумин (1 мг/мл). Публикуется (Ullman, 1981) с разрешения издательства Elsevier/North Holland Biomedical Press.

рядов, гидролизует почти все заместители в каждой связавшейся с ней полимерной молекуле субстрата. При этом продукт образует в воде вторую фазу, которая выглядит как мутная суспензия, состоящая из маленьких капель. Наоборот, в том случае, когда фермент не окружен отрицательно заряженными антителами, гидролиз макромолекулярного субстрата происходит по случайному принципу и после одного или нескольких гидролитических актов высвобождается растворимый продукт, не вызывающий помутнения. Изменение мутности реакционной смеси в результате ферментативной реакции пропорционально числу отрицательно заряженных антител, присоединенных к меченному ферментом антигену. Именно этот факт мы использовали в иммунометрическом активационном анализе.

На рис. 8-6 приведена типичная кривая, полученная при турбидиметрическом иммунометрическом анализе на основе активации фермента. Сам антиген почти не влияет на активность фермента, связанного с антителами. Однако добавление избытка сукцинилированных (отрицательно заряженных) антител активирует фермент более чем в два раза. Кривая имеет двухфазный характер, так как при очень высоких концентрациях антигена сукцинилированные антитела расходуются и их не хватает для активации комплексов антигена с антителами, мечеными при помощи фермента.

Анализ можно проводить с продолжительной инкубацией или по принципу «смешивания и считывания», как показано на

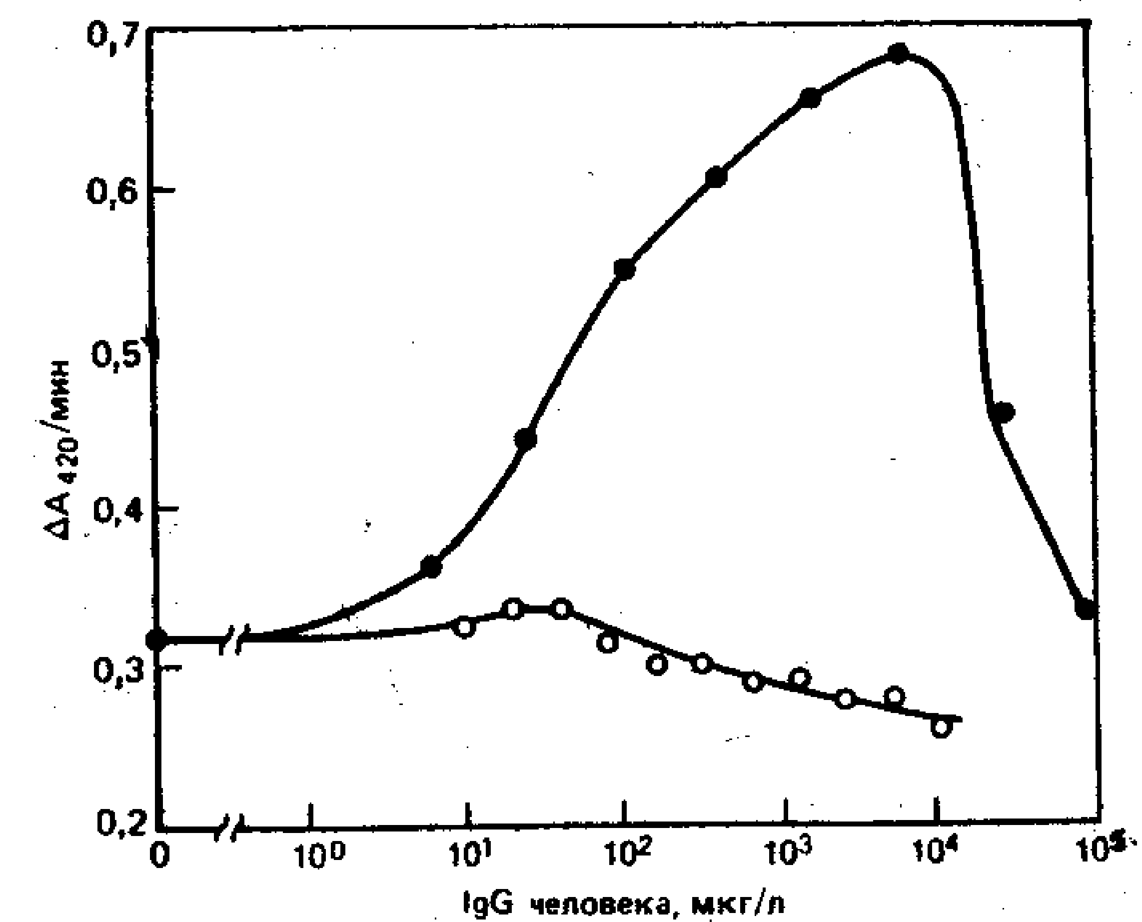


Рис. 8-6. Влияние сукцинилированных антител на активность комплекса IgG человека (антигена) с конъюгатом [β-галактозидаза — антитела]. Антитела против IgG человека, меченные с помощью 0,5 мкг β-галактозидазы, инкубировали 1 ч с IgG человека в 0,3 мл буфера при комнатной температуре. После инкубации прибавляли 0,35 мл буфера, не содержащего (светлые кружки) или содержащего (темные кружки) сукцинилированные антитела (0,17 мг; 45 сукцинильных групп на молекулу), затем 0,4 мкмоль хромогенного высокомолекулярного субстрата (на основе декстрана с мол. массой 40 000) и регистрировали изменение поглощения в течение 30 с при 37 °С. Концентрации IgG человека указаны для конечной реакционной смеси. Реагенты (Gibbons et al., 1980, 1981) растворяли в буфере, состав которого приведен в подписи к рис. 8-5. Публикуется (Gibbons et al., 1981) с разрешения Американской ассоциации клинической химии.

рис. 8-7 для определения С-реактивного белка в сыворотке человека. Хотя при скоростном анализе несколько уменьшается величина сигнала для всех концентраций антигена, такой анализ легче поддается **автоматизации.**

Для сравнения результатов (y), полученных при клиническом обследовании 17 пациентов по методике с продолжительной инкубацией (рис. 8-7), с соответствующими результатами радиальной иммунодиффузии (x) был проведен регрессионный анализ. Он дал следующие результаты: $y=1{,}04x-2{,}1$; $r=0{,}96$; $S_m=7{,}1$ мкг/мл. Коэффициент вариации для повторных ана-

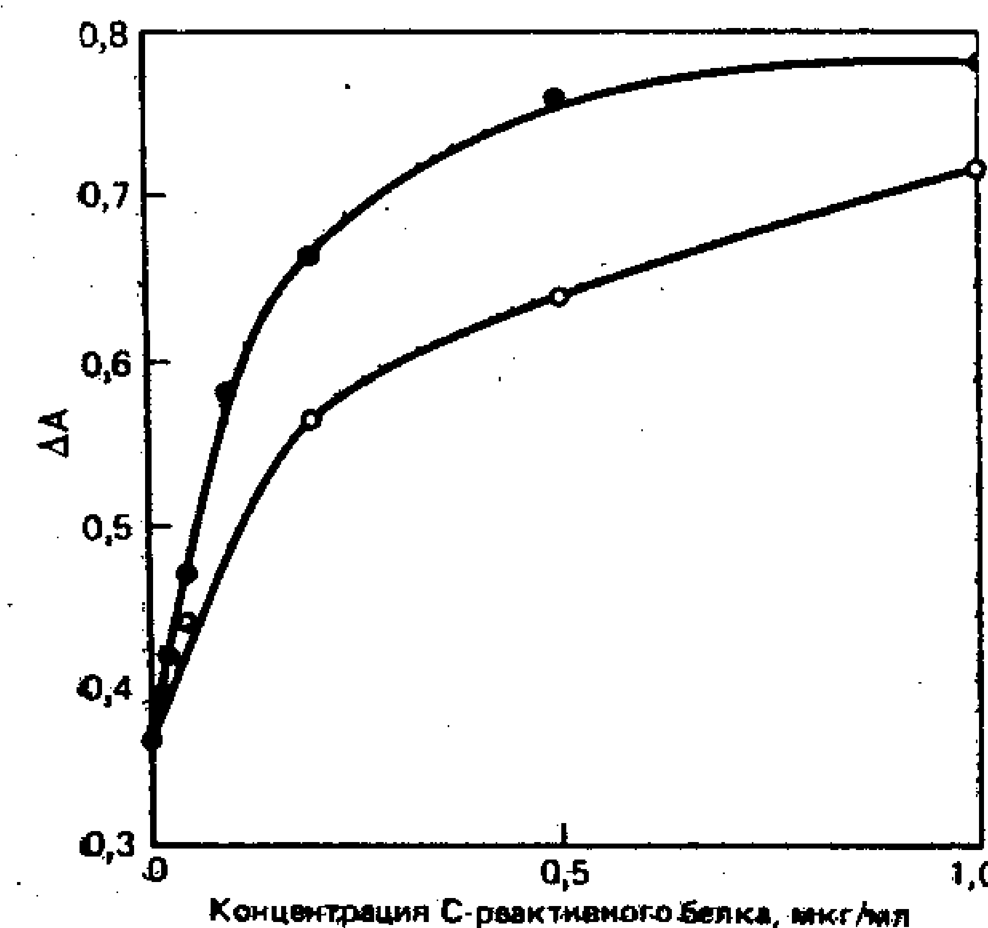


Рис. 8-7. Турбидиметрический иммунный анализ С-реактивного белка в сыворотке человека, основанный на активации фермента. Антитела против С-реактивного белка, меченные с помощью 2 мкг β-галактозидазы, инкубировали с С-реактивным белком в 0,7 мл буфера в течение 2 ч (темные кружки) или 15 с (светлые кружки). Затем прибавляли 0,5 мл раствора, содержащего сукцинилированные антитела, к С-реактивному белку (0,12 мг IgG барана) и хромогенный высокомолекулярный субстрат (на основе декстрана с мол. массой 40 000; 1,6 мкмоль). Сразу же измеряли изменение поглощения за 20 с при 37 °С. Реагенты готовили по методике Гиббонза и др. (Gibbons et al., 1981). Содержание солей в буфере было увеличено на 15% по сравнению с предыдущими опытами (см. подпись к рис. 8-5). Публикуется (Gibbons et al., 1981) с разрешения Американской ассоциации клинической химии.

лизов был равен 5%. Очевидно, что предложенный метод позволяет удовлетворительно определять количество С-реактивного белка в клинических образцах.

Флуориметрический иммуноанализ на основе ингибирования фермента

Чувствительность спектрофотометрических методов, описанных выше, достаточна для количественного определения белка в сыворотке, если его концентрация превышает ~10 мкг/мл. Хотя многие сывороточные белки, представляющие интерес с клинической точки зрения, встречаются именно в таких концентрациях, существуют также белки, для анализа которых нужна гораздо более высокая чувствительность.

При использовании флуорогенного макромолекулярного субстрата вместо хромогенного было достигнуто тысячекратное увеличение чувствительности иммуноанализа на основе ингибирования фермента (Armenta et al., 1985). Заменив в декстрановом субстрате *о*-нитрофенилгалактозид галактозидом умбеллиферона, получили соединение, показанное на рис. 8-8. С помощью этого субстрата и обычного флуориметра можно с точностью ±1% быстро (время считывания 30 с) определять β-галактозидазу в концентрациях, в тысячу раз меньших по сравнению со спектрофотометрическим анализом.

В качестве вещества, присутствующего в сыворотке в малых количествах, был выбран ферритин. Его концентрация в сыворотке представляет интерес для клиники, так как железодефицитная анемия сопровождается снижением уровня ферритина (Worwood, 1979).

Так же как в колориметрическом иммуноанализе на основе ингибирования, антиген метили ферментом. К каждой молекуле ферритина присоединялись три молекулы β-галактозидазы. Активность конъюгата по расщеплению высокомолекулярного флуорогенного субстрата подавлялась при инкубации с антиферритином — антителами козы против ферритина (рис. 8-9). При насыщающих концентрациях антител ингибирование достигало 50%. Добавление вместе с субстратом избытка антител против IgG козы сильно увеличивало ингибирование ненасыщающими концентрациями антиферритина (рис. 8-9). Однако

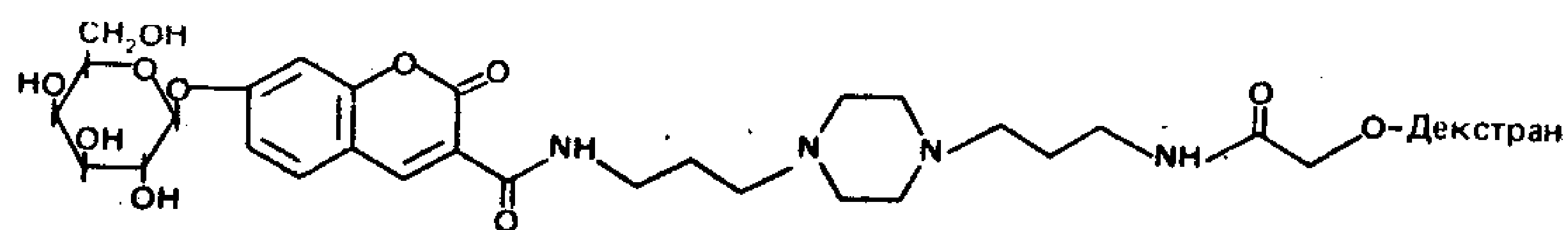


Рис. 8-8. Структура высокомолекулярного флуорогенного субстрата β-галактозидазы.

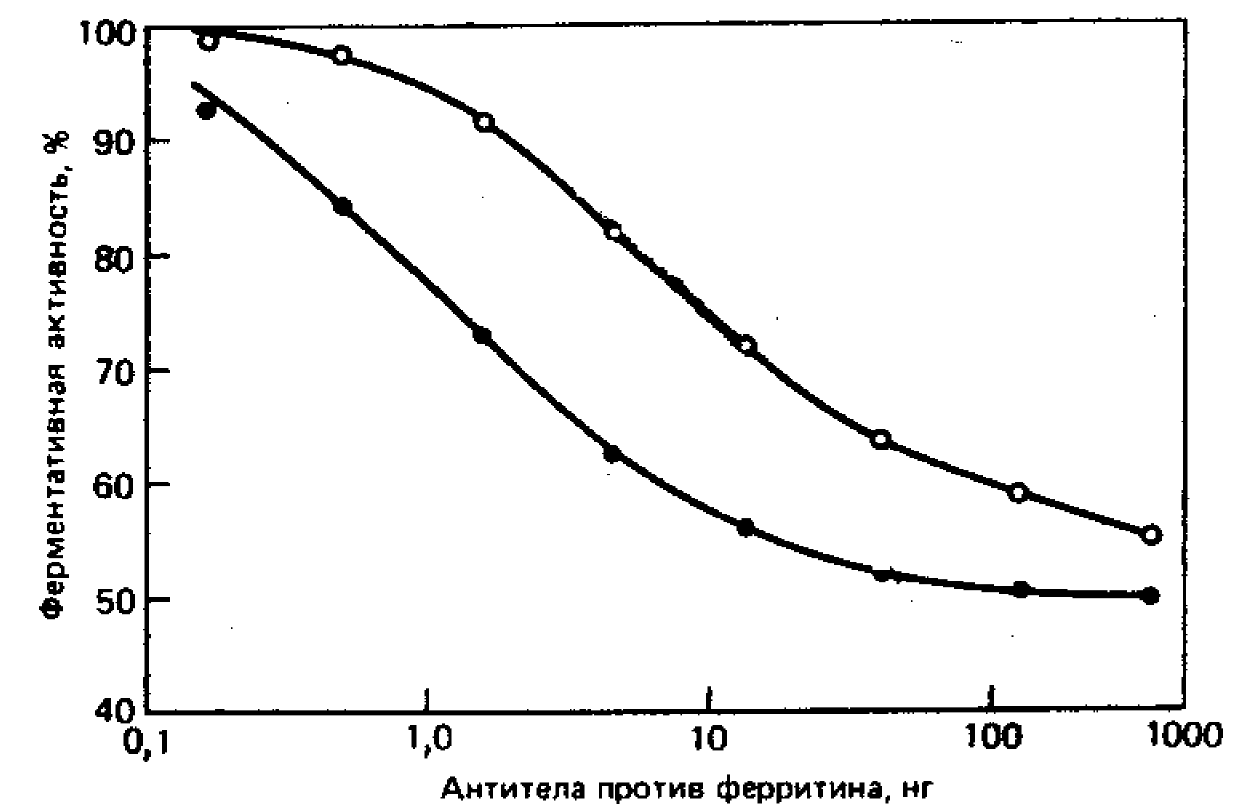


Рис. 8-9. Ингибирующее действие антиферритина на ферритин, меченный β-галактозидазой. β-Галактозидазу (1 нг), связанную с ферритином, инкубировали 2,5 ч с антителами козы против ферритина в 0,2 мл буфера при комнатной температуре. Для измерения ферментативной активности прибавляли 0,7 мл раствора, содержащего 40 нмоль высокомолекулярного флуорогенного субстрата с добавкой (темные кружки) или без добавки (светлые кружки) 1 мкг антител кролика против IgG козы. Флуоресценцию измеряли при помощи флуориметра Varian Fluorochrome, снабженного светофильтрами на 405 и 450 нм для возбуждающего и испускаемого излучения соответственно, с шириной полос пропускания 10 нм. Регистрировали изменение флуоресценции за 30 с при 37 °C. Реагенты (Armenta et al., 1985) растворяли в 17,5 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,0, содержащем 0,23 М NaCl, 8,8 мМ NaN_3, 1,75 мМ ацетат магния и кроличий сывороточный альбумин (5 мг/мл). Публикуется (Armenta et al., 1985) с разрешения издательства.

в случае больших концентраций антиферритина наблюдалось только незначительное усиление ингибирования. Вероятно, действие вторых антител объясняется тем, что при их связывании с антиферритином возрастают стерические препятствия для субстрата.

Чтобы выяснить, можно ли осуществить конкурентный иммуноанализ, инкубировали образцы сыворотки, содержащие ферритин, с антиферритином и ферритином, связанным с ферментом, затем добавляли субстрат и антитела против IgG козы. Полученные результаты (рис. 8-10) показывают, что чувствительность метода достаточна для количественного определения тех концентраций ферритина, с которыми сталкиваются в клинике (10—500 нг/мл). Тем не менее при анализе многих образцов сыворотки, содержащих ингибитор β-галактозидазы, возникают серьезные трудности. Показано, что в некоторых случаях ингибитором служат антитела против β-галактозидазы, подавляющие активность за счет перекрывания доступа высокомолекулярного субстрата к ферменту.

Предложены два способа исключения помех со стороны сыворотки при иммуноанализе ферритина. Во-первых, конъюгат [фермент—ферритин] будет «защищен» от антифермента, если связать фермент с большим числом молекул альбумина. Инте-

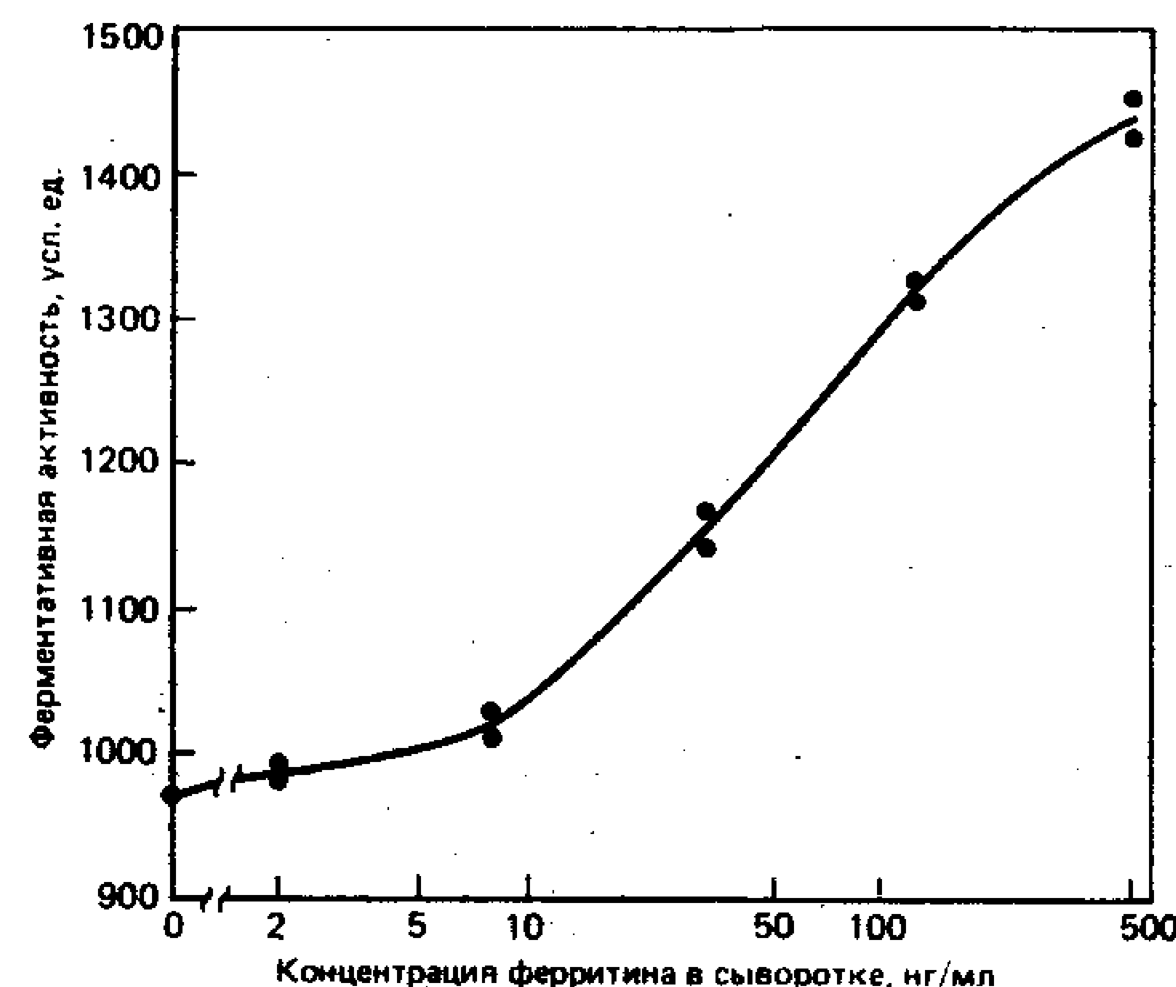


Рис. 8-10. Флуориметрический иммуноанализ сывороточного ферритина, основанный на ингибировании фермента. Для получения стандартных образцов сыворотки с известной концентрацией ферритина добавляли чистый ферритин из печени человека к сыворотке, не содержащей ферритина. Образцы (10 мкл) инкубировали 2 ч при комнатной температуре с конъюгатом [β-галактозидаза (1 нг) — ферритин — альбумин] и 10 мкг неактивной β-галактозидазы в конечном объеме 0,12 мл. Ферментативную активность определяли флуориметрически (см. рис. 8-9) при 37 °С в течение 30 с сразу же после добавления 0,75 мл раствора, содержащего 0,11 мкмоль высокомолекулярного флуорогенного субстрата, и 10 мкл раствора антител против IgG козы. Реагенты (Armenta et al., 1985) растворяли в буфере, указанном в подписи к рис. 8-9. Публикуется (Armenta et al., 1985) с разрешения издательства.

ресно, что это можно сделать без уменьшения каталитической активности[1]. По-видимому, альбумин мешает присоединению антифермента. Во-вторых, было получено неактивное производное β-галактозидазы, в основном сохраняющее антигенные свойства нативного фермента. Чтобы связать антифермент, содержащийся в образцах, можно при проведении иммуноанализа ферритина добавлять большие количества неактивного фермента (многократный избыток по отношению к меченному ферментом ферритину). Сочетание обоих подходов позволяет существенно уменьшить помехи для иммуноанализа ферритина.

Кривая, приведенная на рис. 8-10, была получена в опытах с ферментным конъюгатом, связанным с альбумином, при добавлении неактивного фермента. Ферритин можно количественно определять в диапазоне 10—500 нг/мл. Результаты определений (y) хорошо коррелируют с данными стандартного радиоиммуноанализа (x). Регрессионный анализ показал следующее: $y=0{,}80x-5{,}2$; $r=0{,}97$; $S_m=8{,}3$ нг/мл. Сыворотки некоторых пациентов, использованные в этих опытах, обладали сильным ингибирующим действием. Однако результаты, полученные двумя методами, оказались сходными.

[1] Стерическое ингибирование ферментативной активности по расщеплению высокомолекулярного флуорогенного субстрата сильно зависит от электростатических взаимодействий. Так, субстрат (несущий большой положительный заряд) легко блокируется при соединении ферритина, меченного ферментом, с практически нейтральными антителами, но не блокируется ковалентно связанным альбумином, который заряжен отрицательно.

Обсуждение

Все три метода анализа, описанные в этой главе, основаны на сильных взаимодействиях между антителами и полимерным субстратом. Нативные антитела почти не заряжены и при связывании с антигеном, меченным с помощью фермента, ингибируют каталитическую активность за счет блокирования контактов с высокомолекулярным субстратом. Как и следовало ожидать, увеличение размеров макромолекулярного субстрата, а также присоединение к антителам вторых антител (антииммуноглобулинов) усиливают ингибирование (Crowl et al., 1980).

Как хромогенные, так и флуорогенные макромолекулярные субстраты представляют собой катионные полимеры с большим положительным зарядом. Когда антителам сообщают большой отрицательный заряд, между ними и высокомолекулярным субстратом возникает притяжение. Кулоновские силы преодолевают стерические препятствия. Анализ с любым субстратом можно построить на ингибировании или на активации в зависимости от заряда антител.

Было показано, что возможности представленных здесь методов можно использовать в клинической практике. В этих методах измерение ферментативной активности занимает мало времени (<1 мин), поэтому при автоматизации можно достичь большой производительности. Флуориметрический иммуноанализ на основе ингибирования фермента предполагает продолжительную (около 1 ч) инкубацию перед определением активности, но это не снижает производительности, так как анализы можно проводить целыми партиями. Реагенты, необходимые для анализов, устойчивы в течение многих недель как в растворе, так и после лиофилизации, если использовать подходящие буферы, соли, индифферентные белки (например, альбумин) и противомикробные агенты (например, азид натрия).

При постановке опытов выявились две серьезные проблемы. Во-первых, активность фермента по отношению к высокомолекулярному субстрату очень чувствительна к ионному составу среды. Поэтому ионный состав реагентов нужно очень тщательно контролировать. Точное измерение объемов смешиваемых реагентов и образцов также имеет решающее значение для поддержания постоянного состава конечной реакционной смеси. Различия между образцами сыворотки не создают никаких трудностей, потому что содержание ионов в сыворотке варьи-

рует незначительно, к тому же на образец приходится не больше 1% от конечного объема смеси. Во-вторых, присутствие в сыворотке некоторых веществ (например, антител), связывающихся с β-галактозидазой, создает помехи, если анализ требует длительной инкубации. Однако были предложены эффективные контрмеры.

Показано, что каждый из описанных методов пригоден для анализа различных веществ. По-видимому, с помощью этих методов можно определять любой белковый антиген в сыворотке. Предел обнаружения составляет примерно 10 мкг/мл при использовании хромогенного субстрата и 10 нг/мл в случае флуорогенного субстрата. Мы ограничились рассмотрением анализа антигенов, но ясно, что в модифицированном виде эти методы можно применять и для определения антител (см., например, рис. 6 и 7 в работе Gibbons et al., 1981).

Существует несколько родственных методов иммуноанализа без разделения реакционной смеси, в которых используют стерическое исключение высокомолекулярного субстрата из активного центра фермента. Разработан метод анализа энтеротоксина В из стафилококков с помощью антигена, меченного β-амилазой (Morita, Woodburn, 1978). Из-за сложного измерения активности этот метод представляет ограниченный интерес с точки зрения рутинного использования в клинике. Нго и др. (Ngo et al., 1981) ввели в употребление метод на основе белкового антигена, меченного флуорогенным субстратом β-галактозидазы. Чтобы количественно определить в сыворотке антиген, ему дают возможность связаться с антителами в присутствии антигена, меченного субстратом, потом добавляют избыток β-галактозидазы и измеряют степень гидролиза субстрата.

Иммуноанализ на основе «ферментных каналов»

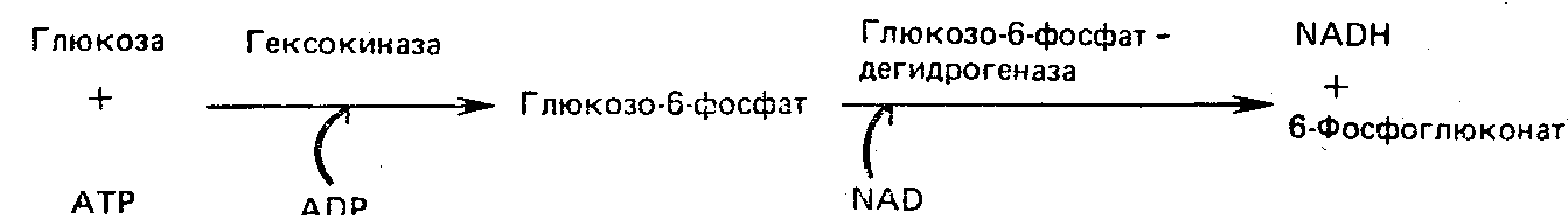
Процесс можно направить по «ферментному каналу», если два или несколько ферментов, катализирующих последовательные реакции, поместить в микросреду, отличающуюся из-за ограниченной диффузии более высокой, чем в основной части фазы, локальной концентрацией продукта 1. Продукт 2 образуется при этом быстрее, чем в случае, когда ферменты находятся в растворе в свободном состоянии или когда в микросреду помещен только один фермент.



В этом разделе мы рассмотрим использование «ферментных каналов» в методах иммуноанализа без разделения реакционной смеси, где два специально подобранных фермента попадают в особое микроокружение вследствие иммунологического связывания. Ранее было описано несколько методов иммуноанализа на основе «ферментных каналов» с использованием различных пар ферментов и различных микросред (Litman et al., 1980; Ullman et al., 1983). Алман и др. (Ullman et al., 1983) подробно обсудили теорию «ферментного канального эффекта» применительно к иммуноанализу, поэтому мы лишь кратко коснемся здесь теоретических основ. Зато мы представим два варианта анализа, которые иллюстрируют сферу приложения, возможности и ограничения методов, связанных с использованием «ферментных каналов». Эти методы классифицируют в соответствии с тем, какой из ферментов является меткой (Ullman et al., 1983).

Первый фермент в качестве метки

Литман и др. (Litman et al., 1980) предложили метод иммуноанализа с применением гексокиназы и глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы. Реакции, катализируемые этой парой, показаны ниже.



Реагентами для анализа служат глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназа, иммобилизованная на гранулах агарозы совместно с антигеном (IgG человека), и антитела против IgG человека, меченные гексокиназой. При выполнении иммуноанализа эти реагенты смешивают с образцами. От конкуренции между антигеном из образца и иммобилизованным антигеном зависит количество антител, меченных гексокиназой, которое присоединится к твердой фазе. Активность пары ферментов, измеряемая по скорости образования NADH после добавления субстратов (глюкозы, ATP и NAD), уменьшается с ростом концентрации антигена в образце (рис. 8-11). IgG удалось определить при концентрации в конечной реакционной смеси 1 нг/мл. Чувствительность метода ограничена явлениями принципиального характера. При измерении ферментативной активности концентрация глюкозо-6-фосфата вначале ниже величины K_M для глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназы. Таким образом, по мере накопления глюкозо-6-фосфата скорость ферментативной реакции возрастает. Когда гексокиназа связывается с гранулами агарозы (в отсутствие антигена в образце), концентрация глюкозо-6-фосфата внутри гранул быстро повышается вследствие их малого объема и медленной диффузии. Напротив, когда гек-

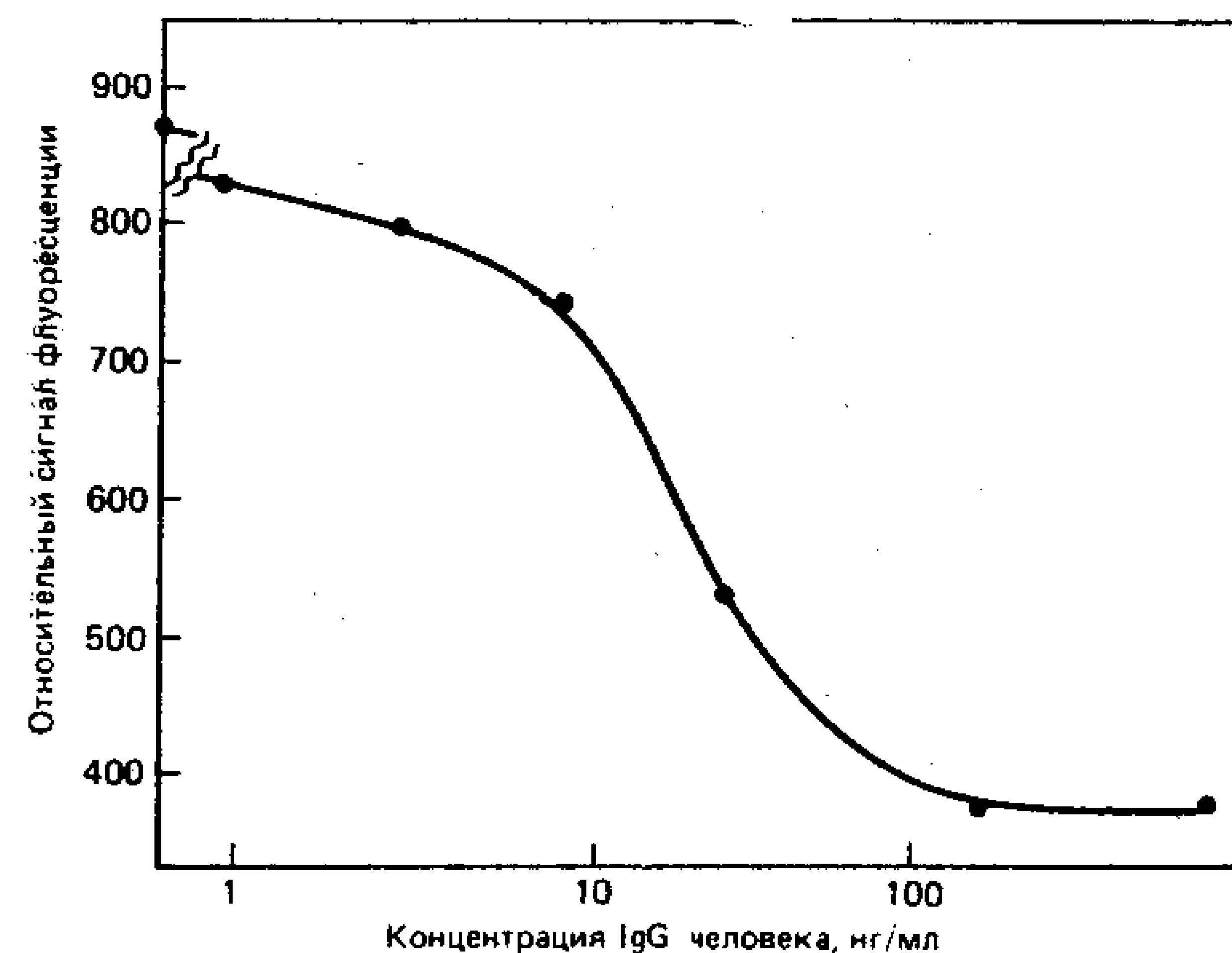


Рис. 8-11. Иммуноанализ IgG человека с применением «ферментных каналов». Суспензию агарозы (1 мкл гранул, связанных с 0,15 МЕ глюкозо-6-фосфат — дегидрогеназы и 0,22 мкг IgG человека) инкубировали 2 ч при комнатной температуре с антителами, меченными гексокиназой (0,12 МЕ), и IgG человека в буфере (50 мМ Bicine, pH 8,4, содержащем 100 мМ KCl, 0,2% бычьего сывороточного альбумина и 0,05% азида натрия). Конечный объем смеси составлял 0,14 мл. Смесь разбавляли с помощью 1 мл раствора, содержащего 50 мМ Bicine, pH 8,4, 100 мМ KCl, 6 мМ $MgCl_2$, 3 мМ ATP, 3 мМ NAD^+, 40 мМ глюкозу и 40% глицерола, интенсивно встряхивали и пропускали через проточную ячейку (диаметр 2 мм) модифицированного флуориметра Varian Fluorochrome[R], термостатируемую при 37 °С. Скорость образования регистрировали в течение 1 мин по испусканию при 450 нм. Для возбуждения использовали длину волны 340 нм. Реагенты получали по методике Литмана и др. (Litman et al., 1980). Реакционная смесь была слегка мутной из-за высокой конечной концентрации агарозы (примерно 100 000 гранул в 1 мл). Публикуется (Ullman, Litman, 1980) с разрешения издательства.

сокиназа не соединяется с гранулами (при насыщающем содержании антигена в образце), концентрация глюкозо-6-фосфата растет гораздо медленнее. Однако в конце концов, независимо от распределения гексокиназы, концентрация глюкозо-6-фосфата превысит K_M и скорость образования NADH достигнет того же самого максимального значения. Из этого следует, что модуляция скорости образования NADH антигеном наблюдается только в течение короткого времени после добавления субстратов.

Это ограничение можно снять, удаляя глюкозо-6-фосфат из реакционной смеси. При добавлении фосфоглюкозоизомеразы, фосфофруктокиназы и ATP глюкозо-6-фосфат превращается во фруктозо-1,6-дифосфат, т. е. основная часть глюкозо-6-фосфата, образующегося под действием гексокиназы в свободной жидкости, исчезает, тогда как глюкозо-6-фосфат, выделяющийся внутри гранул, сохраняется. Кинетика образования NADH становится линейной, а модуляция сигнала антигеном — неограниченной во времени.

Протекание реакции по «ферментному каналу» основано на ограниченной диффузии в агарозных гранулах. Эффективность работы «канала» можно выразить через вероятность того, что молекула глюкозо-6-фосфата, образовавшаяся внутри гранулы, прореагирует с глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназой раньше, чем покинет гранулу. Наибольшая эффективность (0,65), близкая к теоретическому максимуму (1,0), достигается при использовании крупных гранул (20 мкм в диаметре).

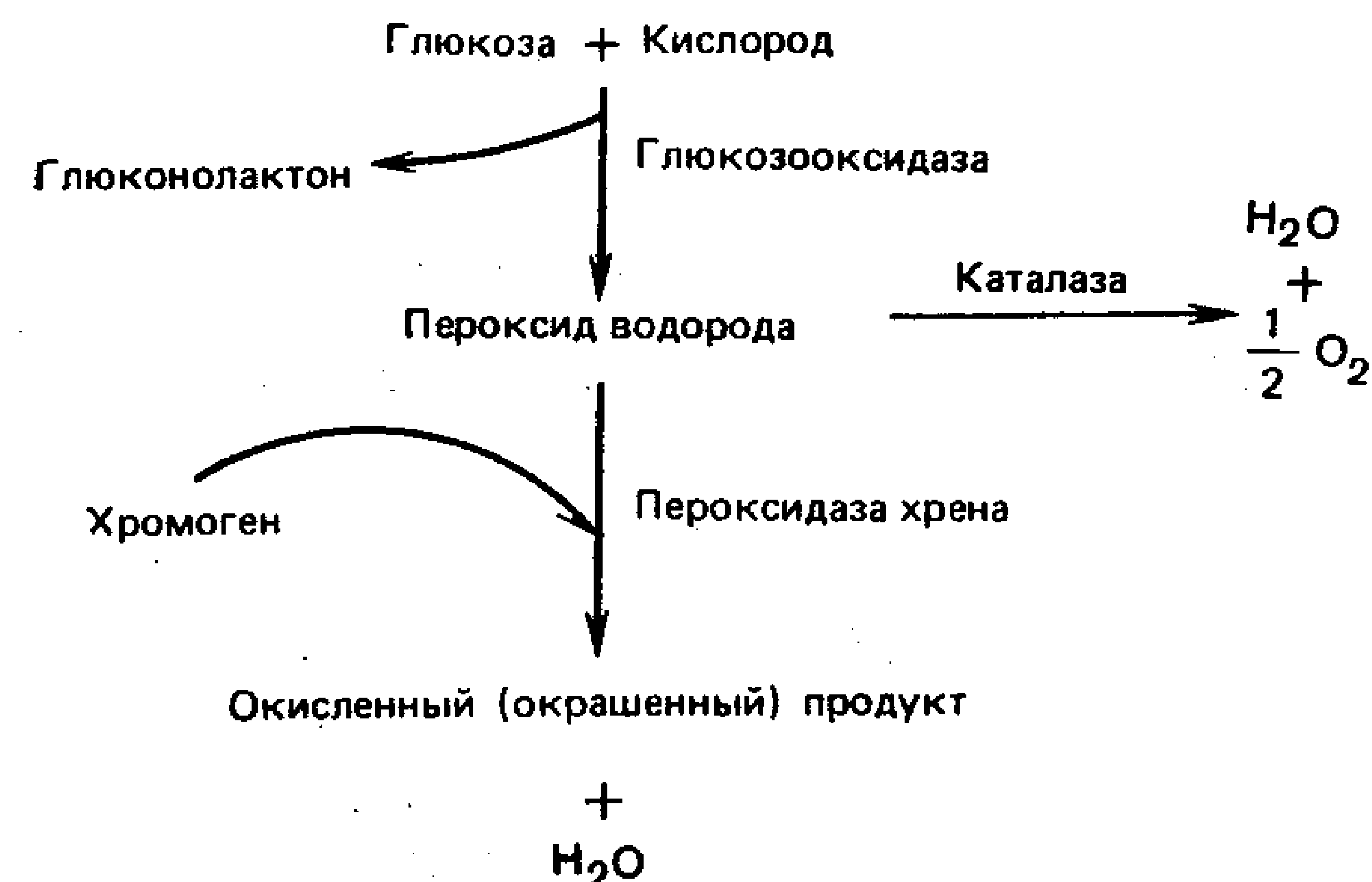
Скорость диффузии из основной части фазы внутрь гранул обусловливает величину фонового сигнала, который не модулируется антигеном. Введение в реакционную смесь большого количества глицерола (как в опыте, показанном на рис. 8-11) для увеличения вязкости среды и уменьшения скорости диффузии глюкозо-6-фосфата снижает фон.

Определение IgG человека (рис. 8-11) хорошо иллюстрирует возможности гомогенного иммуноанализа на основе «ферментных каналов» — удобного и чувствительного метода, не требующего разделения компонентов. Однако ограничения, связанные с практическим осуществлением анализа, не позволяют использовать его в клинике. В частности, необходимость применения крупных гранул для обеспечения высокой эффективности «ферментного канала» противоречит требованию о добавлении постоянного количества агарозного реагента, поскольку в случае крупных гранул удовлетворить этому требованию трудно.

Второй фермент в качестве метки

Теоретически схема анализа, в которой меткой служит второй фермент, предпочтительнее, так как модулируемая антигеном активность вызывает непрерывное усиление сигнала.

Для изучения этого варианта анализа мы выбрали различные па́ры ферментов. Очень привлекательна в качестве метки



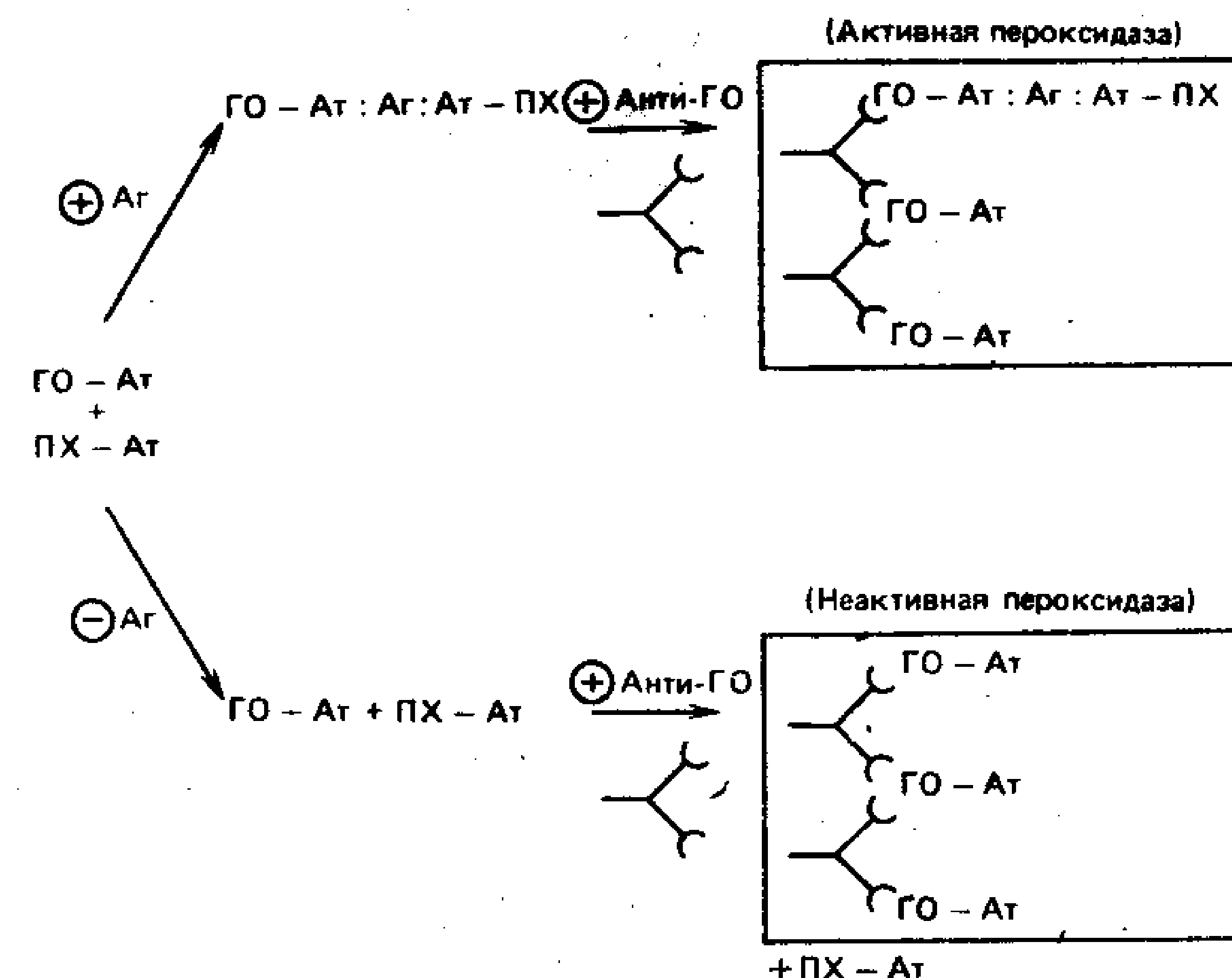


Рис. 8-12. Иммуноанализ на основе «ферментных каналов» с использованием растворимых реагентов. Антиген (Аг) присоединяется к антителам, меченным глюкозооксидазой (ГО—Ат), и антителам, меченным пероксидазой хрена (ПХ—Ат), с образованием растворимого комплекса. Антитела против глюкозооксидазы (не вызывающие ингибирования) добавляют в количестве, достаточном для осаждения всех антител, меченных глюкозооксидазой, а также всех связавшихся с ними молекул антигена и антител, меченных пероксидазой. При добавлении субстратов (глюкозы, кислорода и хромогена) начинает действовать «ферментный канал», причем пероксидаза, содержащаяся в иммунопреципитате, катализирует реакцию с участием пероксида водорода, генерируемого глюкозооксидазой. В результате образуется окрашенный продукт. Пероксидаза вне иммунопреципитата неактивна, так как пероксид водорода, диффундирующий из преципитата, разлагается каталазой, присутствующей в большом избытке.

пероксидаза хрена, поскольку она обеспечивает большое число оборотов для целого ряда хромогенных субстратов. Кроме того, пероксид водорода (продукт 1) можно легко удалять из раствора с помощью каталазы.

Чтобы обойти проблемы, связанные с делением гранулированных реагентов на порции, мы решили разработать метод на основе растворимых веществ, которые соединялись бы в ходе анализа с образованием особой микросреды, пригодной для действия «ферментного канала». На рис. 8-12 показано, как удалось этого достичь. Для уменьшения времени анализа мы использовали меченые антитела и проводили реакции связывания определяемого антигена в присутствии избытка реагентов (ср. с радиоиммунометрическим анализом, Miles, Hales, 1968).

Для анализа в качестве модельного вещества был выбран капсульный антиген из *Haemophilus influenzae* — полирибозофосфат. Он представляет собой большой гетерогенный полимер, состоящий из повторяющихся остатков рибозы, рибитола и фосфата (Crisel et al., 1975). Результаты иммуноанализа полири-

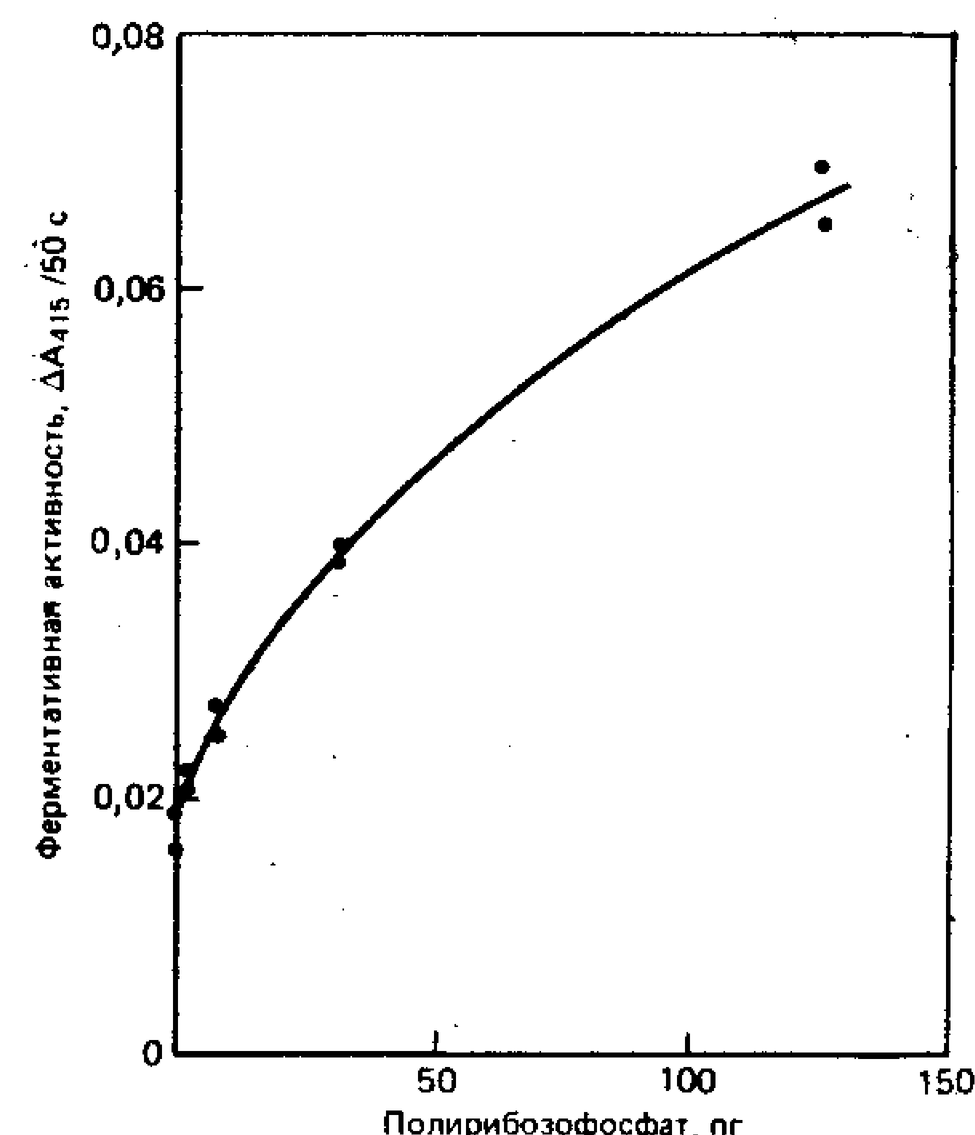


Рис. 8-13. Иммунометрический анализ полирибозофосфата, основанный на «ферментных каналах» с применением растворимых реагентов. Полирибозофосфат растворяли в сыворотке человека. Полученные образцы (10 мкл) смешивали с 10 мкл реагента, содержащего 0,55 мкг антител против полирибозофосфата, меченных пероксидазой хрена, и 0,20 мкг антител против полирибозофосфата, меченных глюкозооксидазой, затем добавляли 20 мкл реагента, содержащего антитела против глюкозооксидазы (0,22 мг белка/мл), 5% полиэтиленгликоля и 0,2% твина-20. Полученную смесь инкубировали при комнатной температуре с легким круговым встряхиванием в течение 15 мин, затем добавляли 0,96 мл реагента, содержащего 250 мМ глюкозу, 10 мМ 2,2′-азиноди-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновую кислоту) (хромоген) и каталазу (500 мкг/мл). Сразу же измеряли изменение поглощения при 415 нм за 50 с при 37 °C. Реагенты (Gibbons et al., в печати) растворяли в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,2, содержащем 150 мМ NaCl и 0,1% овальбумина. Публикуется (Gibbons et al., в печати) с разрешения издательства.

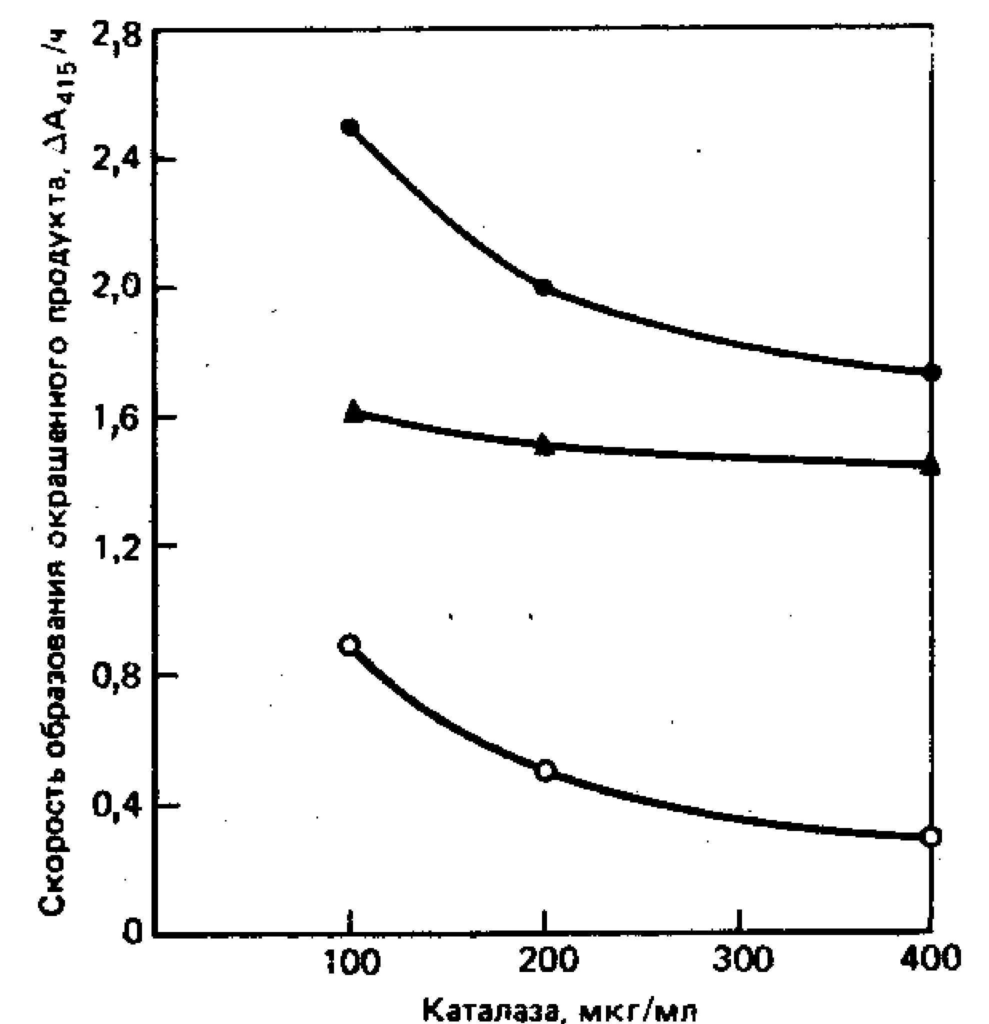


Рис. 8-14. Влияние каталазы на фоновый сигнал и сигнал, вызываемый антигеном, в иммуноанализе, основанном на «ферментном канале» с применением растворимых реагентов. Реагенты (Gibbons et al., в печати) растворяли в 10 мМ натрий-фосф. буфере, pH 7,2, содержащем 150 мМ NaCl и 1% овальбумина (в случае реагентов А и Б) или 0,1% овальбумина (в случае реагента В). В 1 мл реагента А содержалось 120 мкг конъюгата [пероксидаза хрена — антитела против полирибозофосфата] и 200 мкг конъюгата [глюкозооксидаза — антитела против полирибозофосфата]. Реагент Б содержал антитела против глюкозооксидазы, разбавленные до концентрации 0,44 мг/мл. Реагент В содержал 284 мМ глюкозу, 12 мМ 2,2′-азиноди-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновую кислоту) и каталазу, конечные концентрации которой в реакционной смеси указаны на рисунке. Аликвоты воды (10 мкл), содержащие 1 нг полирибозофосфата (темные кружки), или без полирибозофосфата (светлые кружки) смешивали с 10 мкл реагента А и 10 мкл реагента Б в лунках платы для микротитрования. Плату закрывали крышкой и встряхивали в течение 90 мин при 37 °C. Добавляли реагент В (220 мкл) и сразу же измеряли поглощение в лунках. Инкубировали еще 30 мин при 37 °C со встряхиванием и повторяли измерения. На рисунке представлено изменение поглощения за эти 30 мин. Темные треугольники показывают разность измерений в присутствии и в отсутствие антигена. Публикуется (Gibbons et al., 1984) с разрешения издательства.

бозофосфата на основе «ферментного канала» с использованием растворимых реагентов представлены на рис. 8-13. Анализ обладает очень высокой чувствительностью: предел обнаружения составляет ~5 пг. Как и ожидалось, все необходимые для анализа операции можно выполнить быстро. Реакция между антигеном и двумя антителами, меченными при помощи ферментов, протекает фактически мгновенно. Чтобы вызвать преципитацию, перед добавлением субстратов необходимо инкубировать реакционную смесь с антителами против фермента в течение 15 мин. Встряхивание при инкубации способствует укрупнению маленьких частиц иммунопреципитата. «Ферментный канал» действует оптимально, когда частицы достигают размеров 5—10 мкм.

Несмотря на огромный молярный избыток антител, меченных пероксидазой хрена (ПХ), по сравнению с антигеном (кратный примерно 10^4 при самой высокой концентрации антигена) фоновый сигнал, вызываемый несвязанной ПХ, невелик. Это объясняется тем, что фоновую реакцию эффективно подавляет каталаза. Как видно из рис. 8-14, с ростом концентрации каталазы фон уменьшается, тогда как сигнал, характерный для антигена, существенно не изменяется.

Анализ с помощью растворимых реагентов — самый чувствительный среди известных гомогенных методов иммуноанализа на основе «ферментных каналов». В этом отношении он приближается к наиболее чувствительному методу ELISA. Рассмотренный метод позволяет определять не только растворимые антигены, подобные полирибозофосфату, но и целые микроорганизмы, как, например, *Chlamydia trachomatis* (Gibbons et al., 1984). Пока этот метод не был использован в клинике. Достоинства метода привлекут к нему внимание, если удастся преодолеть помехи, создаваемые компонентами клинических образцов.

Литература

Armenta R., Tarnowski T., Gibbons T., Ullman E. F. (1985). Improved sensitivity in homogeneous enzyme immunoassays using a fluorogenic macromolecular substrate, Anal. Biochem., **146**, N 1, 211—219.

Crisel R. M., Baker R. S., Dorman D. E. (1975). Capsular polymer of *Haemophilus influenzae*, Type b, J. Biol. Chem., **250**, 4926.

Crowl C. P., Gibbons T., Scheneider R. S., 1980. Recent advances in homogeneous enzyme immunoassays for haptens and proteins. In: Immunoassays: clinical laboratory techniques for the 1980's, R. Nakamura, ed., Alan R. Liss, New York.

Gibbons I., Armenta R., DiNello R. K., Ullman E. F., Nonseparation enzyme channeling immunometric assay. In: Immobilized enzymes and cells, a volum of Methods in Enzymology, K. Mosbach, ed., Academic Press, New York, in press.

Gibbons I., DiNello R. K., Greenburg R. R., Olson J., Ullman E. F., 1984. Sensitive homogeneous enzyme immunoassays for microbial antigens. In: **Rapid**

detection and identification of infectious agents, D. J. Kingsbury and S. Falkow, ed., Academic Press, New York (in press).

Gibbons I., Hanlon T. M., Skold C. N., Russell M. E., Ullman E. F. (1981). Enzyme enhancement immunoassay: a homogeneous assay for polyvalent ligands and antibodies, Clin. Chem., **27**, 1602.

Gibbons I., Skold C., Rowley G. L., Ullman E. F. (1980). Homogeneous enzyme immunoassay for proteins employing β-galsctosidase, Anal. Biochem., **102**, 167.

Litman D. J., Halon T. M., Ullman E. F. (1980). Enzyme channeling immunoassay: a new homogeneous enzyme immunoassay technique, Anal. Biochem., **106**, 223.

Miles L. E. M., Hales C. N. (1968). Labeled antibodies and immunological assay systems, Nature, **219**, 186.

Morita T. N., Woodburn M. J. (1978). Homogeneous enzyme immunoassay for Staphylococcal enterotoxin B, Infection and Immunity, **21**, 666.

Ngo T. T., Carrico R. J., Boguslaski R. C., Burd J. F. (1981). Homogeneous substrate-labeled fluorescent immunoassay for IgG in human serum, J. Immunol. Methods, **42**, 93.

Pepys M. B. (1981). C-reactive protein fifty years on, Lancet, **1**, 653.

Skold C. N. (1981). U. S. Patent, 4, 268, 663.

Ullman E. F., 1981. Homogeneous enzyme immunoassay techniques for proteins. In: Monoclonal antibodies and developments in immunoassays, A. Albertini and R. Ekins, eds., Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Ullman E. F., Gibbons I., Litman D. J., Weng L., DiNello R., 1983. Highly sensitive enzyme channeling immunoassay for macromolecules. In: Immunoenzymatic Techniques, S. Avrameas et al., eds., Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.

Ullman E. F., Gibbons I., Weng L., DiNello R., Stiso S. N., Litman D. J., 1983. Homogeneous immunoassays and immunometric assays employing enzyme channeling. In: Diagnostic Immunology: Technology Assassment and Quality Assurance, (CAP Conference, 1983), R. M. Nakamura and J. H. Rippey, eds., College of American Pathologists, Skokie, Illinois.

Ullman E. F., Litman D. J., 1980. Enzyme channeling immunoassay. A new homogeneous enzyme immunoassay technique. In: Enzyme Engineering, H. H. Weetall and G. P. Royer, eds., Plenum Publishing Corporation, New York, vol. 5.

Worwood M. (1979). Serum ferritin, CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, **10**, 171.

Иммуноанализ с помощью ферментов, заключенных в липосомы

У. Дж. Литчфилд, Дж. У. Фрейтаг

Введение

Липосомы (Bangham et al., 1985) представляют собой мембранные везикулы, самопроизвольно образующиеся при суспендировании различных липидов в воде. Везикулы можно получить в виде крупных частиц, содержащих воду в нескольких внутренних отсеках, или в виде структур меньшего размера с одной внутренней полостью. В водные области, окруженные двухслойными липидными мембранами, можно заключить вещества-маркеры, например растворимые белки, ионы или флуорофоры, если добавить их к суспензии при получении липосом. Кроме того, липосомные мембраны можно метить антигенами или антителами или разрушать с помощью ряда агентов.

После первого сообщения о гомогенном иммуноанализе с использованием антител и системы комплемента для лизиса липосом, сенсибилизированных липидом A (Kataoka et al., 1971), было опубликовано по крайней мере 15 работ с описанием аналогичных методик (рис. 9-1). Эти работы посвящены определению специфических антител (Uremura, Kinsky, 1972; Rosenquist, Vistness, 1977), IgG (Braman et al., 1984), гормонов (Hsia, Tan, 1978; Tan et al., 1981; Braman et al., 1984) и лекарственных препаратов, таких, как теофиллин (Haga et al., 1980,

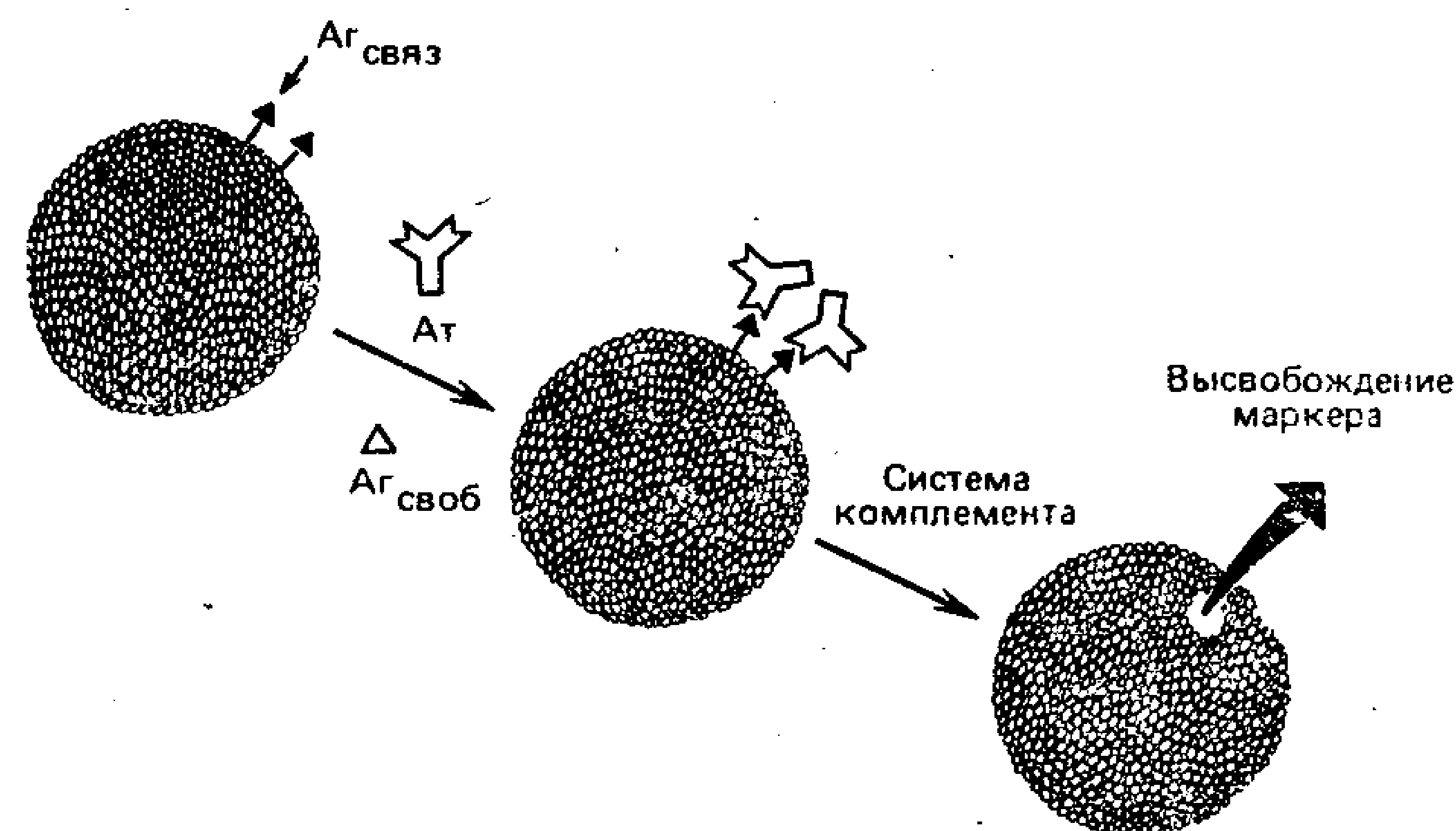


Рис. 9-1. Схема иммуноанализа с использованием липосом, содержащих фермент, и системы комплемента. Свободный антиген ($Аг_{своб}$) конкурирует со связанным ($Аг_{связ}$) за антитела (Ат). Лизис липосом происходит в результате активации комплемента антителами, присоединившимися к их поверхности.

1981). Во всех этих случаях для лизиса везикул необходима система комплемента, а мембраны должны содержать природные липидные антигены или ковалентно присоединенные гаптены.

Мы описали новый метод иммуноанализа для модельного вещества дигоксина, не требующий комплемента или применения меченых липосом (рис. 9-4) (Litchfield et al., 1984; Freytag, Litchfield, 1984). Вместо них мы использовали новые конъюгаты типа [гаптен—цитолизин], например [уабаин—мелиттин], теряющие литическую активность при связывании с антителами против гаптена. Такой вариант иммуноанализа с применением ферментов, заключенных в липосомы, обладает большими преимуществами по сравнению с методами на основе системы комплемента.

Методы

Вводя в состав мембран холестерол или используя поверхностно-активные вещества, такие, как додецилфосфат или стеариламин, можно получить разные по размерам и зарядам липосомы из целого ряда фосфолипидов, различающихся природой связанной с фосфатом группы. Размеры липосом могут изменяться от нескольких нанометров до нескольких микрометров. Однако для большинства методов иммуноанализа нужны крупные везикулы с одной внутренней полостью, способные высвобождать значительные количества заключенного в них маркера. Большие везикулы диаметром 0,1—1 мкм, содержащие одну полость, можно получить несколькими способами, например вливанием раствора фосфолипидов в эфире в теплую воду (Deamer, Bangham, 1976) или так называемым выпариванием в обращенных фазах (Szoka, Papahadjopoulos, 1978). Согласно последнему методу, фосфолипиды сначала растворяют в органическом растворителе, потом смешивают с водным буфером и получают эмульсию. Далее под вакуумом удаляют органический растворитель, и в результате образуются липосомы. В работе, о которой здесь пойдет речь, был использован модифицированный метод разбавления детергента, или диализа (Mimms et al., 1981).

По этому методу при совместном растворении яичного лецитина (24 мг), холестерола (4,2 мг) и детергента (3,75 мл, или 200 ммоль октилглюкозида/л воды) получают смешанные мицеллы, которые затем диализуют против 50 мМ *трис*-буфера, pH 7,8. Поскольку критическая концентрация мицеллообразования для октилглюкозида велика, он легко удаляется за несколько часов диализа при комнатной температуре. Когда в качестве маркера в смешанные мицеллы вводили щелочную фосфатазу, получали липосомы, содержащие до 40% фермента.

Для отделения иммобилизованного фермента от свободного липидные везикулы пропускали через колонку с сефарозой 4В-Cl, уравновешенной трис-буфером. Фракции, содержащие липосомы, идентифицировали по поглощению (или мутности) при 280 нм, а для обнаружения фракций, содержащих свободную щелочную фосфатазу, измеряли ферментативную активность по расщеплению *п*-нитрофенилфосфата, регистрируя поглощение при 410 нм. Активность фермента, заключенного в липосомы, не проявлялась, пока везикулы не разрушали добавлением детергента, например бриджа-58 (1 мл/л).

Для реализации идеи иммуноанализа с помощью конъюгатов типа [гептен—цитолизин] был синтезирован низкомолекулярный конъюгат [мелиттин (литический 26-членный пептид из пчелиного яда) — уабаин (аналог дигоксина)]. Были изучены и другие цитолитические агенты, такие, как цитотоксины I и II из яда кобры (*Naja naja oxiana*), но их литическая активность оказалась более низкой, чем у мелиттина. При получении конъюгата уабаин сначала обрабатывали избытком периодата натрия для раскрытия углеводного остатка, затем вводили в реакцию с мелиттином и восстанавливали цианоборгидридом (Litchfield et al., 1984). С помощью ^{3}H-уабаина было показано, что с одной молекулой мелиттина обычно соединяются три молекулы уабаина.

Литическую активность конъюгата [уабаин—мелиттин] измеряли при 37 °С, добавляя его к 2 мл суспензии липосом в трис-буфере, содержащем 2 мМ *п*-нитрофенилфосфат. По поглощению при 410 нм определяли количество освободившегося фермента и вычисляли концентрацию литического конъюгата. Неожиданно выяснилось, что литическая активность конъюгата [уабаин—мелиттин] несколько выше, чем у мелиттина, хотя уабаин не обладает литическим действием. При выполнении гомогенного иммуноанализа дигоксина инкубировали различные его количества в трис-буфере при 37 °С в течение 5 мин с антителами к дигоксину (константа связывания $>10^9$ л/моль), конъюгатом [уабаин—мелиттин] и субстратом фермента, а затем добавляли липосомы.

Обсуждение

В методах иммуноанализа, основанных на использовании системы комплемента (рис. 9-1), антигены, такие, как теофиллин или тироксин, сначала иммобилизуют, т. е. присоединяют к поверхности липосом, содержащих фермент-маркер. Свободный антиген из образца конкурирует с иммобилизованным антигеном за связывание с антителами, причем для активации каскада реакций системы комплемента необходимо, чтобы два связавшихся антитела оказались в непосредственной близости

на поверхности липосомы. Белки комплемента проделывают довольно большие отверстия в мембранах везикул. Это дает возможность либо ферменту-маркеру выходить наружу, либо молекулам субстрата проникать внутрь липосом.

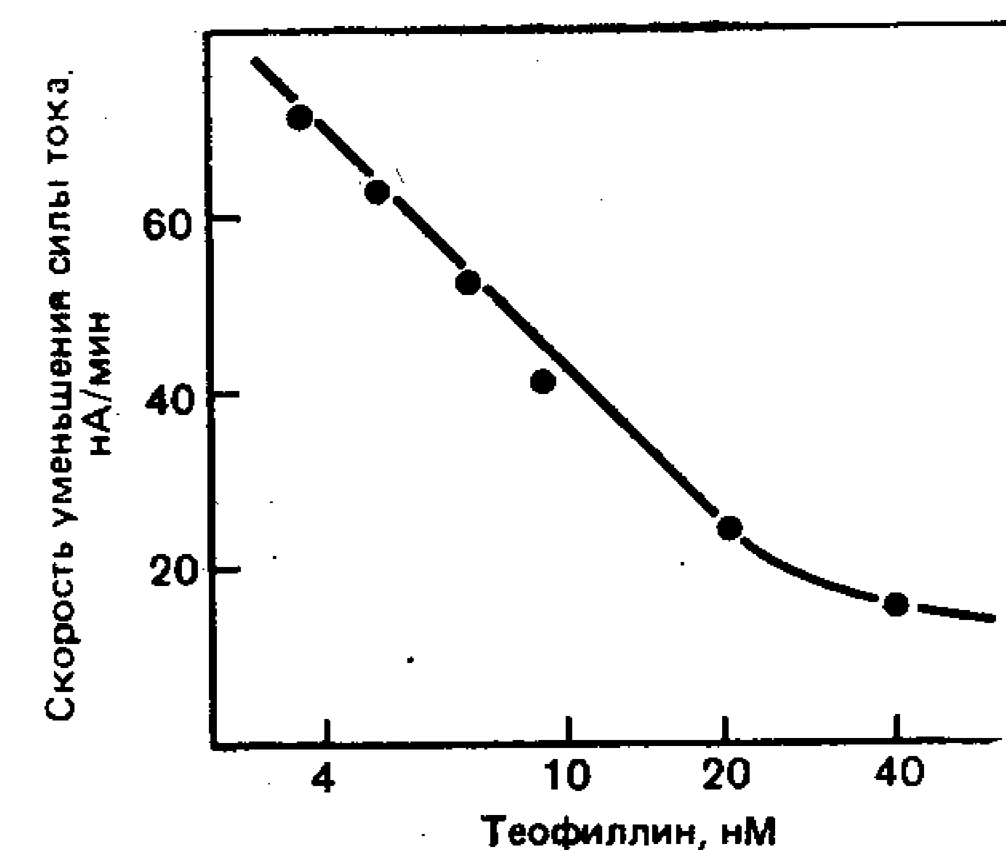


Рис. 9-2. Калибровочная кривая для определения теофиллина методом иммуноанализа с использованием липосом, содержащих фермент, и системы комплемента (Haga et al., 1981). Активность пероксидазы хрена, освободившейся при лизисе везикул, измеряли с помощью кислородного электрода.

Очень удачным примером иммуноанализа, зависящего от комплемента, может служить метод на основе липосом с несколькими внутренними отделами, полученных из конъюгата [теофиллин—фосфатидилэтаноламин] (Haga et al., 1981). При смешивании липосом с антителами и комплементом высвобождается заключенная в липосомы пероксидаза хрена, активность которой измеряют при помощи кислородного электрода. Свободный теофиллин, содержащийся в образцах, мешает связыванию антител с липосомами и, таким образом, снижает литическую активность системы комплемента. В результате уменьшается скорость расходования кислорода. Это позволяет построить калибровочную кривую для надежного определения свободного лекарственного препарата в интервале 4—40 нМ (рис. 9-2). Важно, что высокая чувствительность достигается при использовании дешевой электродной системы детектирования. Столь же обнадеживающие результаты были получены при анализе тироксина и IgG в сыворотке спектрофотометрическим методом на основе комплемента (Braman et al., 1984). Использованные липосомы были покрыты специфическими антигенами и содержали щелочную фосфатазу. Авторы показали, что результаты определения тироксина и IgG этим методом довольно хорошо коррелируют с результатами радиоиммунологического анализа. По-видимому, фермент, активность которого демаскируется комплементом, остается в данном случае внутри липосом, но они становятся проницаемыми для субстрата.

Иммуноанализ на основе комплемента обладает тремя основными недостатками. Во-первых, при получении липосом нужно строго нормировать содержание препарата, придающего им чувствительность к лизису (как видно из рис. 9-3, одна молекула теофиллина должна приходиться на две молекулы фосфатидилхолина). Это ограничивает применимость метода для определения других веществ. Анализ каждого нового вещества

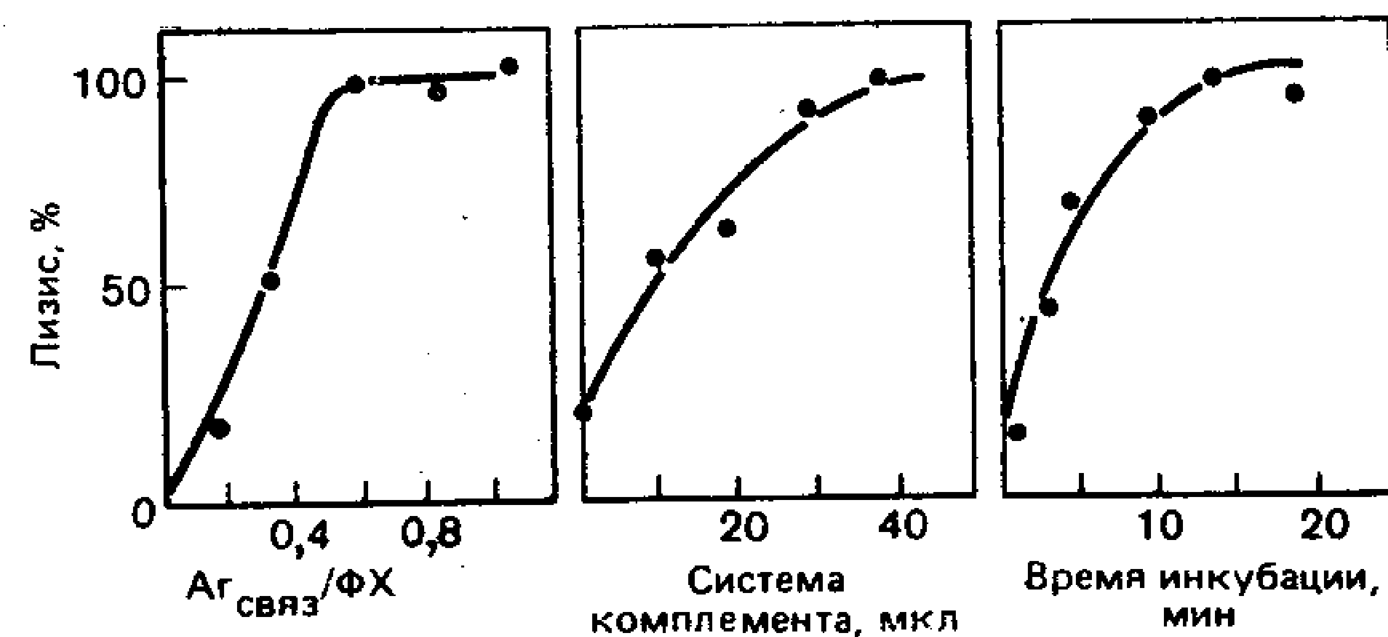


Рис. 9-3. Оптимизация иммуноанализа, основанного на использовании липосом, содержащих фермент, и системы комплемента. Показано, как влияют на лизис липосом различные факторы: молярное соотношение между антигеном, связанным с липосомами, и фосфатидилхолином (*слева*); объем добавляемой сыворотки, содержащей систему комплемента (*в центре*); время инкубации липосом с комплементом (*справа*).

требует новых липосом, но получать и стабилизировать их трудно. Во-вторых, для лизиса везикул необходимы довольно большие количества комплемента из морской свинки, а он дорог и неустойчив. В-третьих, на выполнение анализа уходит немало времени, до 20 мин и больше. Это невыгодно отличает метод от других вариантов гомогенного анализа, позволяющих опреде-

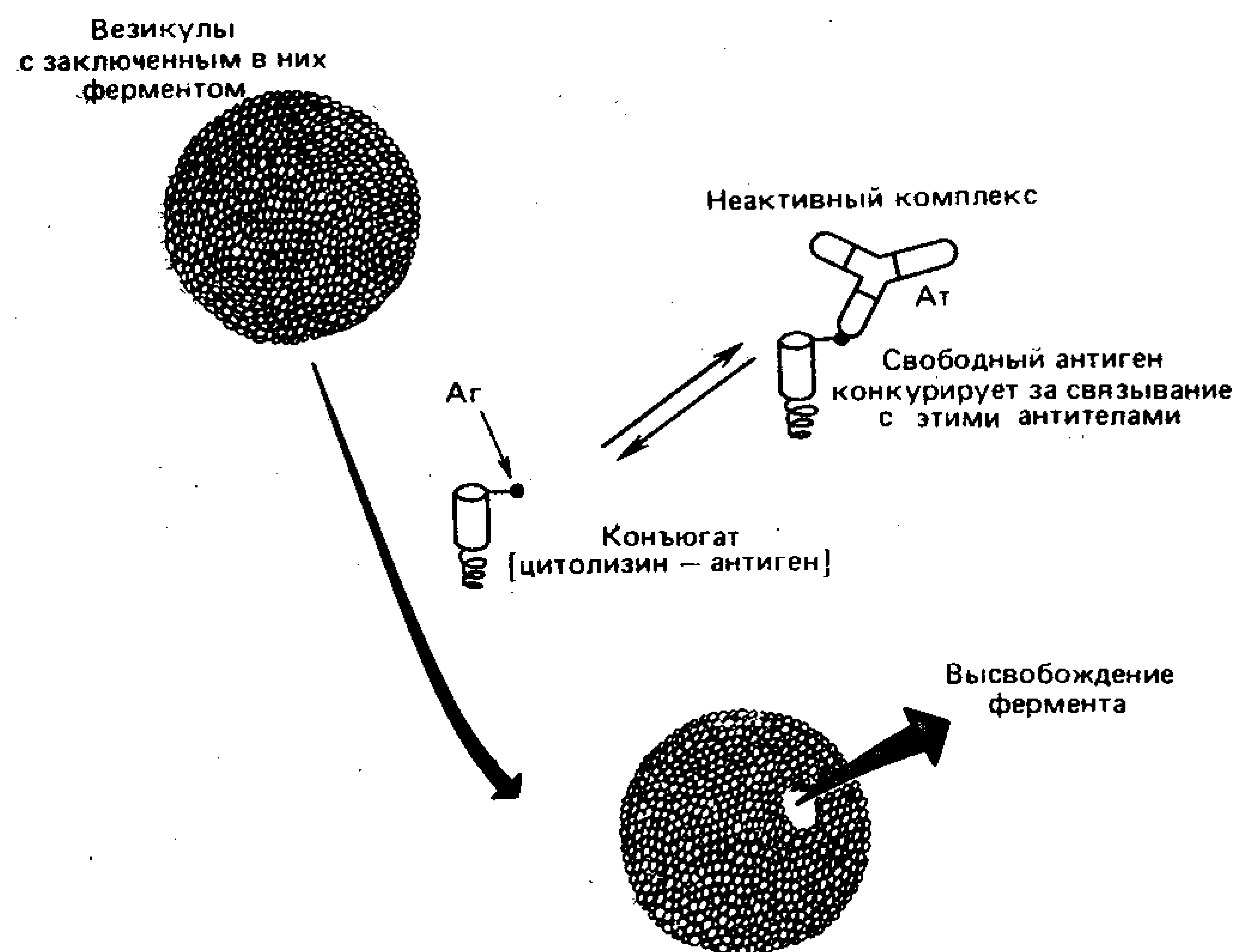


Рис. 9-4. Схема иммуноанализа с помощью фермента, включенного в липосомы, без использования системы комплемента. Свободный антиген конкурирует с конъюгатом [определяемое вещество — цитолизин] за связывание с антителами. При образовании комплекса с антителами конъюгат теряет способность разрушать липосомы.

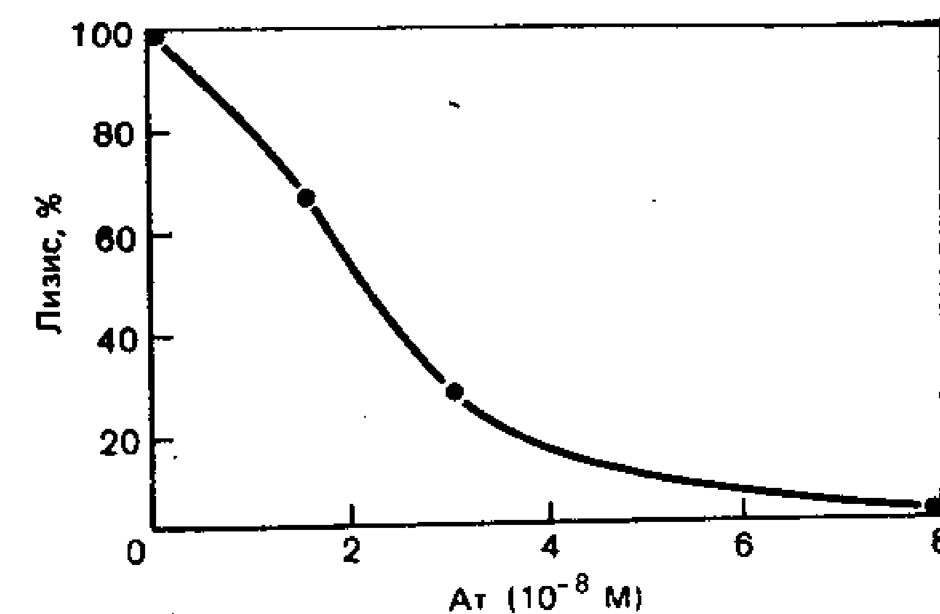


Рис. 9-5. Влияние специфических антител на литическую активность конъюгата [определяемое вещество — цитолизин]. Различные количества антител против дигоксина, очищенных иммунологическими методами, инкубировали 5 мин при 37 °С с конъюгатом [уабаин — мелиттин] (20 нм) и затем добавляли липосомы.

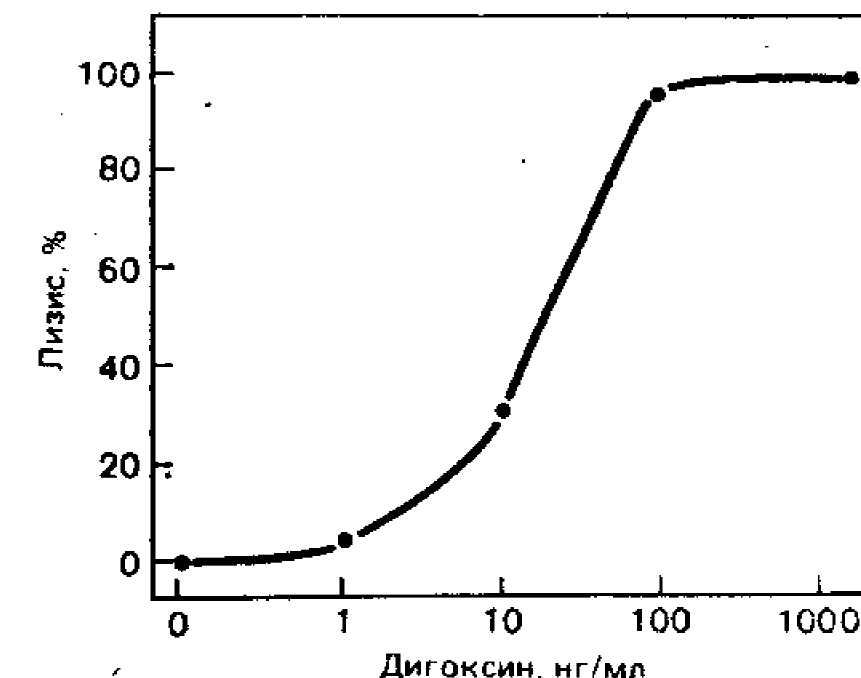


Рис. 9-6. Гомогенный иммуноанализ дигоксина с использованием липосом и конъюгата [определяемое вещество — цитолизин]. Различные количества свободного дигоксина инкубировали 5 мин при 37 °С с конъюгатом [уабаин — мелиттин] (20 нМ) и антителами (78 нМ). Затем добавляли липосомы и измеряли активность освободившегося фермента, регистрируя поглощение при 410 нм.

лять вещества, подобные теофиллину, тироксину и IgG, за 5 мин или быстрее.

Указанных недостатков лишен иммуноанализ на основе цитолизина (рис. 9-4), в котором используют липосомы с одной полостью, образующиеся при удалении детергента диализом. Новый метод не требует ни присоединения лекарственного препарата к липосомам, ни использования комплемента и обеспечивает быстрый лизис везикул. Липосомы, применяемые для анализа по этому методу, при хранении в замороженном виде в атмосфере аргона устойчивы в течение одного года (т. е. непроницаемы для заключенной в них щелочной фосфатазы), но теряют устойчивость при удалении из их состава холестерола. Как показала электронная микроскопия с негативным окрашиванием, средний размер везикул составляет примерно 0,2 мкм. Добавление к везикулам конъюгата [уабаин—мелиттин] (20 нмоль/л) сразу же вызывает полный лизис, но лизиса не происходит в случае предварительной инкубации конъюгата с избытком антител против дигоксина (рис. 9-5). Проводя такую инкубацию в присутствии известных количеств дигоксина, можно построить калибровочную кривую (рис. 9-6).

Важное преимущество нового метода состоит в том, что одни и те же липосомы можно использовать с разными конъюгатами [цитолизин—определяемое вещество], в частности с конъюгатами [цитолизин—гаптен]. Действительно, липосомы, которые применялись в описанных здесь опытах, были использованы также с конъюгатом [биотин—мелиттин] для определе-

ния свободного биотина (Litchfield et al., 1984). Мы надеемся, что дальнейшие исследования приведут к созданию методов иммуноанализа ряда лекарственных препаратов с помощью этих же липосом и сравнительно легкодоступных конъюгатов [лекарственный препарат—мелиттин]. Однако для определения предельно малых концентраций веществ (ниже 1 нМ) понадобятся более мощные цитолизины. В литературе имеются подробные сведения о 38 цитолитических агентах (Thelestam, Mollby, 1979), причем литическая активность у многих из них может быть выражена сильнее, чем у мелиттина.

Возможности описанного здесь метода, как и всех иммунохимических методов на основе ферментов, заключенных в липосомы, ограничены степенью сродства антител, и прежде чем рекомендовать новый метод для клинических целей, следует оценить его как с позиций доступности липосом, так и с точки зрения аналитических характеристик. В продаже еще нет наборов для анализа с помощью липосом, содержащих ферменты. Это обусловлено главным образом малодоступностью исходных веществ и сложностями крупномасштабного производства устойчивых везикул. Мало пока сведений о компонентах сыворотки, которые могут создавать помехи для анализа. Тем не менее мы считаем, что все отмеченные трудности будут преодолены и метод получит широкое распространение.

Примечание

Рис. 9-2 и 9-3 (Haga et al., 1981) публикуются с разрешения издательства Academic Press, Inc., владеющего авторскими правами. Рис. 9-4 и 9-6 (Litchfield et al., 1984) публикуются с разрешения журнала Clinical Chemistry.

Литература

Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, J. Mol. Biol., **13**, 238.
Braman J. C., Broeze R. J., Bowden D. W., Myles A., Fulton T. R., Rising M., Thurston J., Cole F. X., Vavis G. F. (1984). Enzyme membrane immunoassay (EMIA), Bio/Technology, **1**, 349.
Deamer D. W., Bangham A. D. (1976). Large volume liposomes by an ether vaporization method, Biochem. Biophys. Acta, **443**, 629.
Freytag J. W., Litchfield W. J. (1984). Liposome mediated immunoassays for small haptens (digoxin) independent of complement, J. Immunol. Methods, **70**, 133.
Haga M., Itagaki H., Sugawara S., Okano T. (1980). Liposome immunosensor for theophylline, Biochem. Biophys. Res. Commun., **95**, 187.
Haga M., Sugawara S., Itagaki H. (1981). Drug sensor: Liposome immunosensor for theophylline, Anal. Biochem., **118**, 286.
Hsia J. C., Tan C. T. (1978). Membrane immunoassay: Principle and aplications of spin membrane immunoassay, Ann. NY Acad. Sci., **308**, 139.
Kataoka T., Inoue K., Galanos C., Kinsky S. C. (1971). Detection and specificity of lipid A antibodies using liposomes sensitized with lipid A and bacterial lipopolysaccharides, Eur. J. Biochem., **24**, 123.
Litchfield W. J., Freytag J. W., Adamich M. (1984). Highly sensitive immunoassays besed on use of liposomes without complement, Clin. Chem., **30**, **1441**.
Mimms L. T., Zampighi, Nosaki Y. (1981). Phospholipid vesicle formation and transmembrane protein incorporation using octyl glucoside, Biochemistry, **20**, **833**.
Rosenquist E., Vistness A. I. (1977). Immune lysis of spin loaded liposomes incorporating cardiolipin: A new sensitive method for detecting anticardiolipin antibodies in syphilis serology, J. Immunol. Methods, **15**, **147**.
Szoka F., Papahadjopoulos D. (1978). A new procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse phase evaporation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, **4194**.
Tan C. T., Chan S. W., Hsia J. C. (1981). Membrane immunoassay: A spin membrane immunoassay for thyroxine, Methods Enzymol., **74**, 152.
Thelestam M., Mollby R. (1979). Classification of microbial, plant and animal cytolysins based on their membrane-damaging effects on human fibroblasts, Biochem. Biophys. Acta, **557**, 156.
Uremura K., Kinsky S. C. (1972). Active vs. passive sensitization of liposomes toward antibody and complement by dinitrophenylated derivatives of phosphatidyl ethanolamine, Biochemistry, **11**, 4085.

Глава 10

Иммуноанализ с применением индикаторных полосок

Д. Дж. Литман

Введение

Иммуноферментный анализ (ИФА) стал одним из наиболее распространенных и универсальных методов биохимического анализа. Лабораторные методы ИФА имеют большое значение для клинической биохимии, ветеринарии, микробиологии, акушерства и гинекологии. В этой книге на многочисленных примерах показаны богатые возможности методов ИФА, позволяющих идентифицировать и количественно определять различные антигены, важные с точки зрения клиники. Многообразие применений ИФА в значительной мере обусловлено устойчивостью ферментных меток и их способностью усиливать сигналы.

Среди новых практических приложений ИФА можно особо выделить методы быстрого анализа «на месте». Эти методы, дающие достоверные сведения о состоянии организма в текущий момент времени, будут, по-видимому, очень полезными для STAT-анализа в больницах (от англ. on-Site Testing Analytical Technique), для контроля дозировки лекарственных препаратов во врачебных кабинетах, для самооценки состояния в домашних условиях. Ключевые требования, предъявляемые к практическим нелабораторным методам, сводятся к простоте, удобству, высокой скорости и надежности. В идеале для выполнения анализа «на месте» должно быть достаточно самых минимальных навыков, оборудования и операций по калибровке.

Методы иммуноферментного анализа с помощью индикаторных полосок полностью удовлетворяют этим требованиям, пригодны для использования вне лаборатории и, что особенно важно, могут применяться с различными хромогенными субстратами. Ферментные метки в отличие от флуоресцентных и радиоактивных легко детектировать по продуктам катализируемых ими реакций. Это делают визуально или с помощью простых портативных приборов. Очевидно, что индикаторные полоски — очень удобные матрицы для реагентов, позволяющие упростить обработку образцов и разделение компонентов реакционной смеси.

В этой главе описаны типичные методы иммуноанализа с применением индикаторных полосок, разработанные в нашей лаборатории. Все методы объединяет использование системы детектирования на основе «ферментных каналов» и применение в качестве иммунореактивного носителя листов целлюлозы. Более подробную информацию об условиях экспериментов и эксплуа-

тационных характеристиках методов можно найти в оригинальных работах (Litman et al., 1980; Litman et al., 1983; Chen et al., 1984; Zuk et al., 1985).

Системы генерации сигнала

В иммуноанализе с помощью индикаторных полосок можно использовать как гетерогенные (требующие разделения компонентов), так и гомогенные (не требующие разделения) ферментативные системы детектирования. Гетерогенные индикаторные методы, аналогичные твердофазному методу ELISA (Engvall, Perlmann, 1971), могут обладать высокой чувствительностью, но они обычно требуют раздельной иммобилизации фермента и субстрата, отделения свободных компонентов от связанных, включают много стадий. Иммуноанализ с помощью индикаторных полосок значительно упрощается, если он не связан с разделением компонентов. Чтобы создать удобные системы генерации сигнала, мы перенесли принципы гомогенного иммуноанализа на основе «ферментных каналов» (Litman et al., 1980) в иммунохимический анализ с применением индикаторных полосок.

В иммуноанализе на основе «ферментных каналов» используют два фермента, катализирующих последовательные реакции, причем продукт реакции с участием первого фермента служит субстратом для второго (рис. 10-1). Эффективность катализа сопряженных реакций максимальна, когда молекулы обоих ферментов находятся в непосредственной близости на поверхности твердых частиц или в составе молекулярных агрегатов (Mosbach, Mattiason, 1970). В этом случае благодаря высокой локальной концентрации промежуточного продукта второй фермент работает с бо́льшим числом оборотов. Мы использовали пару ферментов, составленную из глюкозооксидазы и пероксидазы.

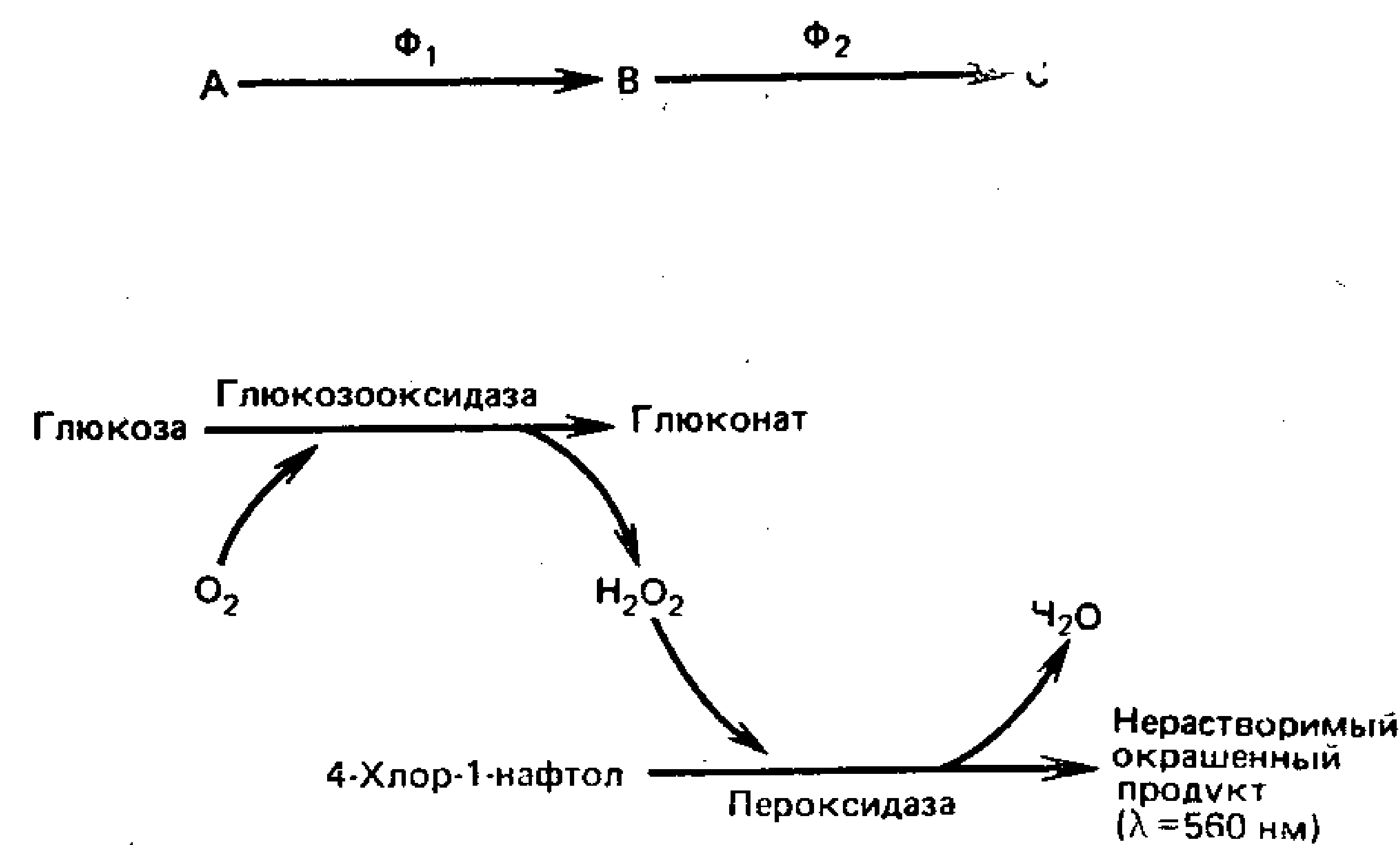


Рис. 10-1. «Канальный» эффект на основе последовательных ферментативных реакций, катализируемых глюкозооксидазой и пероксидазой хрена. Публикуется с разрешения издательства (Litman et al., 1983).

Существуют различные варианты иммуноанализа на основе «ферментных каналов», но все они основаны на том, что в результате иммунологического связывания один из участников сопряженной пары (как правило, второй фермент) попадает в микросреду, содержащую комплементарный фермент. Катализ эффективен только в том случае, когда молекулы двух ферментов находятся в близком контакте. Несвязавшийся конъюгат, содержащий второй фермент, вносит пренебрежимо малый вклад в аналитический сигнал, так как концентрация промежуточного продукта в растворе очень низка. Следовательно, нет необходимости в разделении связанных и свободных компонентов реакционной смеси. Особенности детектирования с помощью сопряженных ферментативных реакций обсуждены в обзоре Алмана и др. (Ullman et al., 1983), а применение метода для определения белков рассмотрено в данной книге (гл. 8).

Матрицы для индикаторных полосок

В идеале поверхность иммунореактивной индикаторной полоски должна быть однородной, не склонной к неспецифическим взаимодействиям и пригодной для контролируемой иммобилизации различных веществ с помощью удобных методов. В качестве матрицы для ковалентной иммобилизации реагентов мы выбрали листы хроматографической целлюлозы, так как они обладают подходящими химическими и физическими характеристиками. Целлюлоза гидрофильна, достаточно однородна, ей несвойственно неспецифическое связывание. Кроме того, она доступна в виде листов разной толщины и плотности. На целлюлозе с помощью целого ряда хорошо отработанных методов (Lilly, 1976) можно иммобилизовать большие количества ферментов и антител. Это позволяет получать индикаторные полоски, обладающие высокой стабильностью и иммунологической активностью.

Материалы и методы

В этом разделе описано получение важнейших реагентов и приведены типичные методики анализа. Более подробную информацию о реагентах и выполнении анализа читатель может найти в публикациях, процитированных выше.

Материалы

Пероксидаза хрена (тип VI), глюкозооксидаза (тип V), тритон QS-44, S-ацетилмеркаптоянтарный ангидрид, N-этилмалеимид и цистеин были приобретены у фирмы Sigma Chemical Company; 4-хлорнафтол, метапериодат натрия, 2,2′-окси-бис-(этиламин) и *п*-нитрофенилхлорформиат — у фирмы Aldrich Chemical Co.; 1,1′-карбонилдиимидозол — у фирмы Polysciences; бычий сывороточный альбумин — у фирмы Miles Laboratories; хроматографическая фильтровальная бумага (марки 1C, 31ET Chrom) — у фирмы Whatman Inc.

Методы иммобилизации

Индикаторные полоски получали путем ковалентного присоединения антител и ферментов из раствора к химически активированной хроматографической бумаге. Для качественного анализа морфия и хорионического гонадотропина (хориогонадотропина) применяли бумагу марки 1C, а для количественного иммунохроматографического анализа теофиллина — бумагу марки 31ET. При получении активированной бумаги использовали, причем с равным успехом, обычные реагенты для иммобилизации, такие, как метапериодат натрия, 1,1′-карбонилдиимидазол (КДИ) и *п*-нитрофенилхлорформиат. Ниже приведена типичная методика с использованием КДИ.

Бумажные индикаторы для качественного анализа. Диски фильтровальной бумаги (Whatman 1C, диаметр 12,5 см) инкубируют 2 ч в 0,5 л 0,2 М раствора КДИ в дихлорметане при 22 °С и затем сушат в течение 30 мин в атмосфере азота. Полученную активированную бумагу инкубируют 4 ч при встряхивании в 15 мл белкового раствора (приготовленного на 0,1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,0, и содержащего в 1 л 0,2 моль NaCl, 200—2000 мг IgG, 200 мг глюкозооксидазы), промывают фосфатным буфером, pH 7,0, погружают в предохраняющий раствор (приготовленный на 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,0, и содержащий в 1 л 150 г сахарозы и 2 г бычьего сывороточного альбумина) и, наконец, высушивают под вакуумом. Содержание иммобилизованного белка обычно составляет 5—100 мкг/см^2. В сухом виде индикаторная бумага может храниться до года.

Бумажные индикаторы для количественного анализа получают на основе бумаги Whatman 31ET только что описанным способом, но из белкового раствора исключают глюкозооксидазу.

Получение конъюгата

Гаптены присоединяли к пероксидазе хрена по двухстадийной методике (Litman et al., 1983). Сначала получали аминопроизводное пероксидазы путем окисления нативного фермента метапериодатом натрия с последующим восстановительным аминированием в присутствии 2,2′-окси-бис(этиламина). Затем аминопроизводное пероксидазы вводили в реакцию с активиро-

ванными эфирами гаптенов. Полученные конъюгаты, содержащие до 14 молекул гаптена на молекулу фермента, сохраняли 95% иммунологической активности и более 65% ферментативной активности.

Конъюгаты пероксидазы с антителами получали по описанному ранее методу (Chen et al., 1984), представляющему собой модификацию тиол-малеимидного метода (Yoshitake et al., 1979).

Измерение отражательной способности

Интенсивность окраски индикаторных полосок измеряли на отражательном спектрофотометре марки «Macbeth» (модель MS2000) и выражали в условных единицах (усл. ед.). Фоновая реакция влажных индикаторных полосок составляла 3—4 усл. ед.

Методика анализа и состав реагентов

Определение морфия. Индикаторную полоску, содержащую антитела против морфия (10 мкг/см^2) и глюкозооксидазу (4 мМЕ/см^2), погружают в 2 мл образца (буферного раствора или мочи) и инкубируют 1 мин. Переносят полоску в 2 мл проявителя (содержащего в 1 л 0,1 моль фосфата натрия; 0,2 моль хлорида натрия; 2 г бычьего сывороточного альбумина, 300 мг 4-хлорнафтола; 50 ммоль глюкозы; 0,25 г тритона QS-44; 300 мг конъюгата пероксидазы с морфием), встряхивают 3—5 с и выдерживают 10 мин. Вынимают полоску, промокают ее для удаления остатков жидкости и измеряют интенсивность окраски с помощью отражательного спектрофотометра марки «Macbeth». Следует отметить, что анализ по существу не зависит от объема образца или проявителя; важно только, чтобы они полностью покрывали поверхность полоски. Все стадии анализа проводят при комнатной температуре.

Ультразвуковой анализ хориогонадотропина человека. Смешивают 1 мл образца (мочи или буферного раствора) со 100 мкл реагента, приготовленного на 0,05 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,2, и содержащего в 1 л 0,1 моль хлорида натрия; 0,25 г тритона QS-44; 2,5 мг конъюгата антител с пероксидазой. Погружают в эту смесь индикаторную бумагу, воздействуют ультразвуком в течение 5 мин, переносят бумагу в проявитель (приготовленный на 0,05 М натрий-фосфатном буфере, pH 6,5, и содержащий в 1 л 0,1 моль хлорида натрия; 2 г бычьего сывороточного альбумина; 300 мг 4-хлорнафтола; 0,25 г тритона QS-44), инкубируют 10 мин при комнатной температуре и измеряют отражательную способность, как указано выше.

Ферментативный иммунохроматографический метод. Добавляют 10—20 мкг образца (буферного раствора, сыворотки или цельной крови) к 1 мл ферментного реагента (приготовленного на 0,1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,0 и содержащего 0,2 моль хлорида натрия; 0,2—1,0 мг конъюгата [теофиллин — пероксидаза]; 100 мг глюкозооксидазы; 2 г неиммунных IgG барана). В полученную смесь погружают край индикаторной полоски (4×90 мм), содержащей иммобилизованные антитела против теофиллина (~30 мкг/см^2), и дают растворителю подняться за счет капиллярных сил до противоположного края полоски (на это уходит ~10 мин). Переносят полоску в проявитель (приготовленный на 0,01 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,0, и содержащий в 1 л 0,02 моль хлорида натрия; 0,5 г тритона QS-44; 400 мг 4-хлорнафтола; 0,05 моль глюкозы; 2 г бычьего сывороточного альбумина). Через 5 мин на бумаге появляется голубая окрашенная область в форме ровной полосы или ракеты. Высота окрашенной области пропорциональна концентрации определяемого вещества. Для количественного анализа предварительно строят калибровочную кривую, отражающую зависимость высоты окрашенного фронта от концентрации теофиллина.

Другие методы

Концентрацию нативных белков определяли по поглощению при 280 нм в случае иммуноглобулинов ($\varepsilon = 2{,}16 \cdot 10^5$ л·моль$^{-1}$×см$^{-1}$) и при 403 нм в случае пероксидазы ($\varepsilon = 1 \cdot 10^5$ л·моль$^{-1}$×см$^{-1}$). Концентрацию конъюгатов измеряли по методу Лоури и др. (Lowry et al., 1951). Для сравнения с результатами других методов морфий и теофиллин определяли с помощью наборов «EMIT^R Opiate» и «EMIT^R Theophylline» (фирма Syva, Пало-Альто), а хориогонадотропин человека — с помощью набора «Tandem-E HCG» (фирма Hybritech, Inc., Сан-Диего) для ферментативного иммунометрического анализа. Моноклональные и поликлональные антисыворотки получали обычными иммунологическими методами и очищали осаждением сульфатом натрия.

Индикаторные полоски для качественного анализа с внутренним стандартом

Методы нелабораторного качественного анализа находят применение в диагностике, когда для лечения важно наличие или отсутствие определенного вещества выше какой-то концентрации. Примером может служить выявление злоупотребления лекарственными препаратами, обнаружение инфекции или белков, связанных с беременностью. Эти методы должны быть скоростными и нечувствительными к внешним условиям; они не

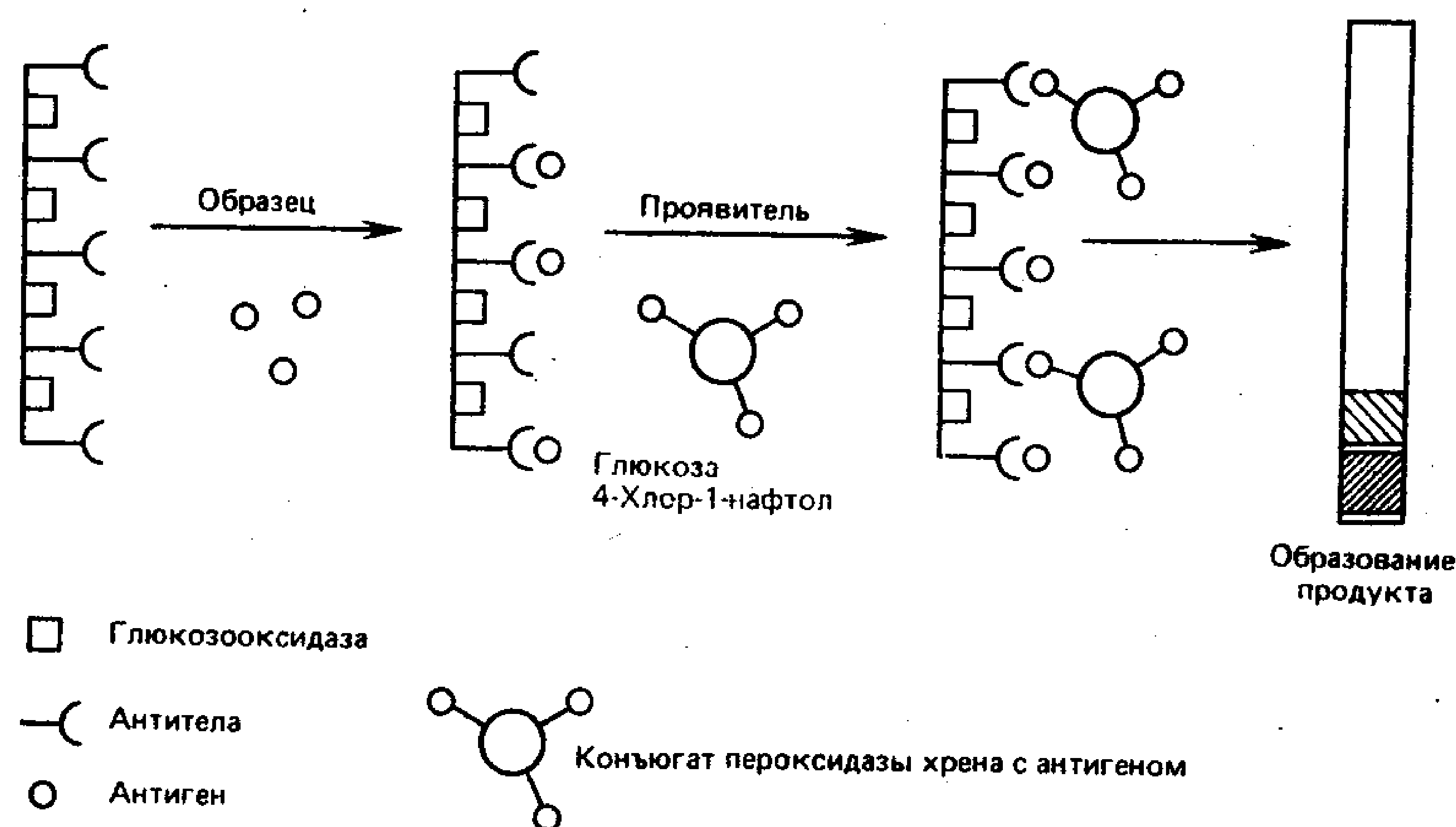


Рис. 10-2. Принцип иммунохимического анализа на основе «ферментных каналов» с применением индикаторных полосок. Публикуется с разрешения издательства (Litman et al., 1983).

должны требовать от оператора специальной подготовки и тщательных манипуляций. Ниже мы опишем индикаторные полоски для определения морфия с использованием «ферментных каналов» и новой системы внутреннего стандарта, компенсирующей внешние факторы.

Принцип и методика анализа

Как показано на рис. 10-2, активную поверхность индикаторной полоски образуют антитела против морфия, иммобилизованные совместно с глюкозооксидазой на подложке из целлюлозы. На первой стадии анализа полоску погружают в жидкий образец. Центры связывания на антителах заполняются молекулами антигена, причем степень заполнения пропорциональна его концентрации. Затем полоску переносят в проявляющий раствор, содержащий конъюгат [пероксидаза—морфий], глюкозу и хромогенный субстрат пероксидазы (4-хлорнафтол). При инкубации с проявителем конъюгат связывается с вакантными центрами на иммобилизованных антителах и катализирует окисление 4-хлорнафтола пероксидом водорода, генерируемым иммобилизованной глюкозооксидазой, с образованием нерастворимого голубого продукта, который остается на поверхности полоски. Через 10 мин визуально или с помощью отражательного спектрофотометра определяют интенсивность окраски.

Как и следовало ожидать, развиваемая на полоске окраска обратно пропорциональна концентрации антигена в образце.

Система детектирования на основе «ферментных каналов» позволяет обойтись без разделения свободных и связанных молекул конъюгата и без стадии промывания. Биологические жидкости (мочу, слюну) можно анализировать без предварительной обработки и разбавления.

Система внутреннего стандарта

Многие свойства ферментных меток исключительно ценны для иммуноанализа в лабораторных условиях, однако нелабораторные методы предъявляют более жесткие требования. Ферментам присущи ограниченная термостабильность, зависимость катализа от времени и температуры, чувствительность к помехам со стороны образца. В лабораторных методах для преодоления этих недостатков применяют ячейки с регулируемой температурой, точно измеряют время и предварительно обрабатывают образцы. Чтобы упростить использование индикаторных полосок, мы создали систему внутреннего стандарта, в которой компенсируются изменения каталитической активности. Эта система, состоящая из совместно иммобилизованных глюкозооксидазы и антител против пероксидазы, отличается от индикаторной полоски для определения морфия только специфичностью антител. Поэтому можно ожидать, что цветные реакции на обеих поверхностях в одинаковой степени зависят от температуры, активности фермента и от помех со стороны образца.

Концентрацию антител против пероксидазы подбирают так, чтобы интенсивность окраски полоски сравнения соответствовала интенсивности окраски индикаторной полоски при концентрации определяемого вещества на уровне предела обнаружения. Результаты анализа определяют по отношению интенсивности окраски индикатора (I) к интенсивности окраски полоски сравнения (R). Если индикаторная полоска окрашена интенсивнее, чем полоска сравнения ($I/R > 1{,}0$), пробу считают отрицательной, в противном случае ($I/R \leqslant 1{,}0$) ее считают положительной.

Концентрация антител и глюкозооксидазы

Скорость формирования окраски на индикаторной полоске зависит от содержания иммобилизованных антител и глюкозооксидазы, а его можно регулировать, изменяя концентрации белков при иммобилизации. Для изучения влияния концентрации антител на интенсивность окраски мы получили индикаторные полоски с различным содержанием антител против морфия при одинаковой активности глюкозооксидазы (4 мМЕ/см^2) и использовали эти полоски для анализа отрицательных образцов мочи (рис. 10-3). С увеличением концентрации антител интенсивность

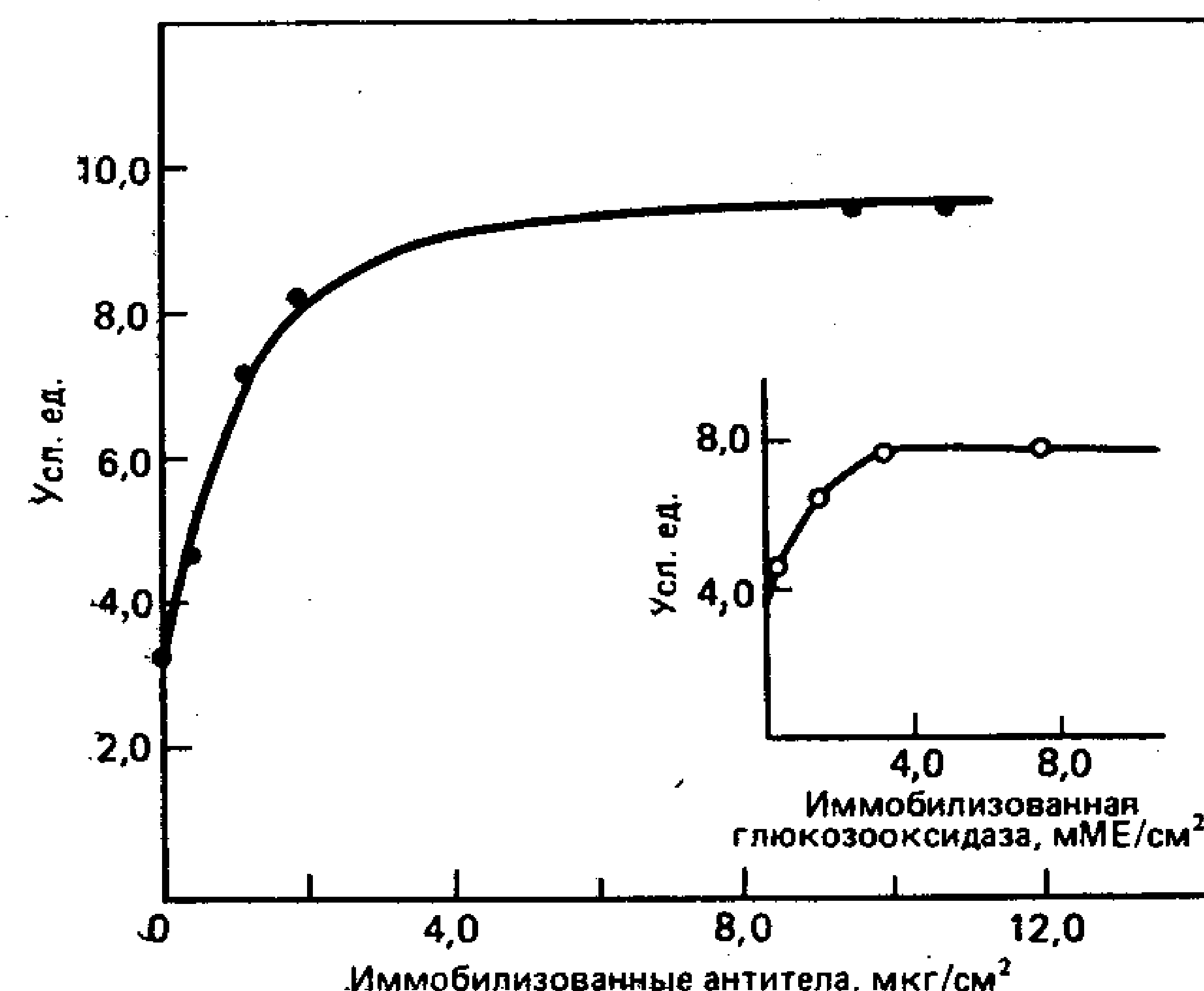


Рис. 10-3. Зависимость интенсивности окраски от концентрации иммобилизованных антител и глюкозооксидазы. Индикаторные полоски с различным содержанием антител (*на основном графике*) или глюкозооксидазы (*на врезке*) использовали для анализа отрицательных образцов мочи, как описано в разд. «Материалы и методы». Публикуется с разрешения издательства (Litman et al., 1983).

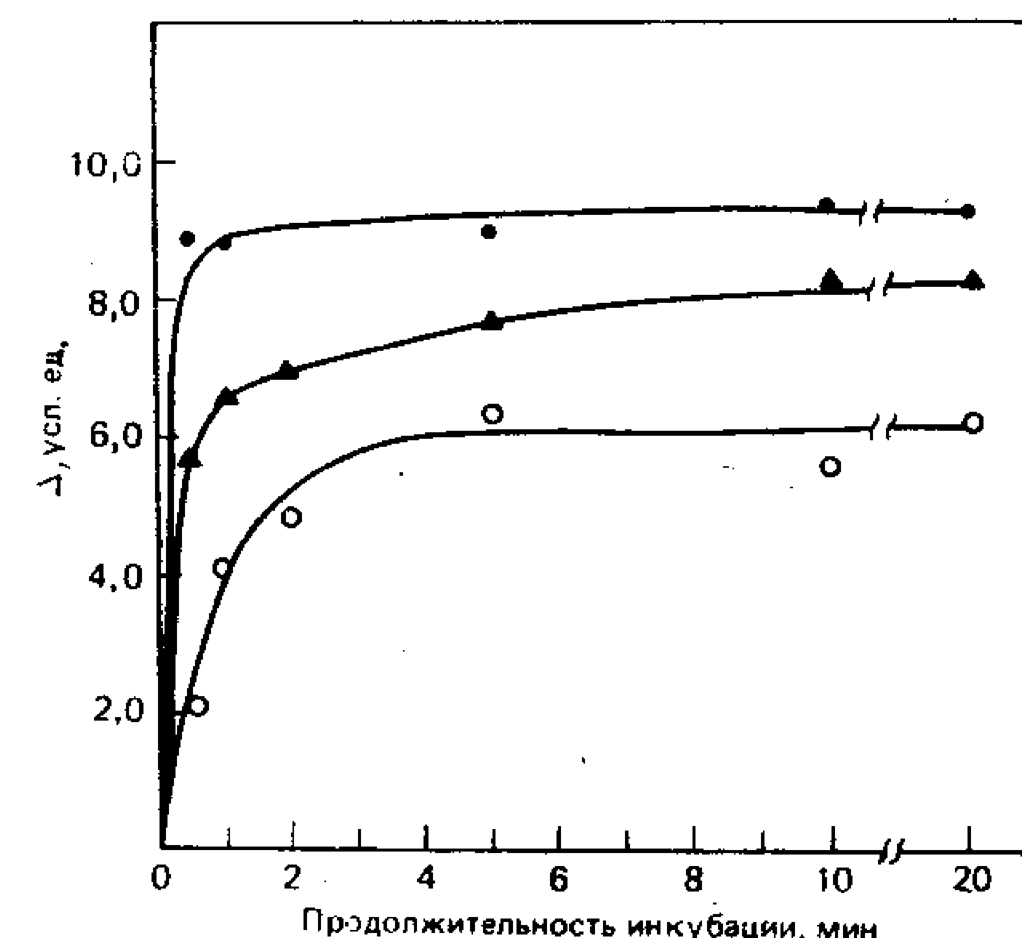
окраски монотонно возрастает и выходит на плато. По-видимому, насыщение при высоких концентрациях антител обусловлено тем, что скорость процесса лимитируется диффузией конъюгата к поверхности индикаторной полоски. Стерическая или ковалентная инактивация антител при иммобилизации маловероятна, поскольку, как было установлено в специальных опытах, связывание ^{3}H-морфия с индикаторной полоской прямо пропорционально концентрации иммобилизованных антител (данные не представлены).

Роль иммобилизованной глюкозооксидазы состоит в том, что она создает высокую локальную концентрацию пероксида водорода и поддерживает реакцию окисления 4-хлорнафтола, катализируемую пероксидазой. Поэтому можно предположить, что скорость формирования окраски на индикаторной полоске будет возрастать с повышением активности глюкозооксидазы, пока локальная концентрация пероксида существенно не превысит $K_м$ пероксидазы. При измерении интенсивности окраски индикаторных полосок с различным содержанием глюкозооксидазы были получены результаты, согласующиеся с этим предположением (рис. 10-3, *врезка*). Интенсивность окраски увеличивается с ростом активности глюкозооксидазы и выходит на плато при ~4 мМЕ/см².

Кинетика связывания антигена

Мы изучили влияние концентрации морфия на кинетику его присоединения к иммобилизованным антителам (рис. 10-4). Скорость связывания и равновесная концентрация связанного морфия пропорциональны его концентрации. Если концентрация морфия выше 100 нг/мл, то связывание происходит быстро и до-

Рис. 10-4. Зависимость аналитического сигнала от продолжительности инкубации образцов. Представлена разность интенсивностей окраски индикаторных полосок и полосок сравнения (Δ, усл. ед.). Индикаторные полоски инкубировали в образцах мочи, содержащих морфий в концентрации 10 (светлые кружки), 100 (темные треугольники) или 500 (темные кружки) мкг/л, а контрольные — в образцах без морфия. Средняя интенсивность окраски отрицательных образцов равна 20,2 усл. ед. Публикуется с разрешения издательства (Litman et al., 1983).



стигает более 80% насыщения уже в течение первой минуты. Как и ожидалось, уменьшение концентрации морфия приводит к замедлению процесса и снижению уровня максимального связывания. Так как все изученные концентрации соответствуют большому избытку определяемого вещества, различия в равновесном связывании обусловлены, по-видимому, недостаточной авидностью антител и законом действия масс. Было найдено, что кинетика связывания конъюгата и высокомолекулярного антигена с поверхностью полоски зависит от их концентрации аналогичным образом (данные не представлены).

Калибровочные кривые для определения морфия

На рис. 10-5 показана зависимость интенсивности окраски индикаторной полоски, содержащей антитела против морфия, и полоски сравнения, содержащей антитела против пероксидазы, от концентрации морфия в образце. Интенсивность окраски индикаторной полоски обратно пропорциональна концентрации определяемого вещества в интервале от 5 до 1000 нг/мл. Предел обнаружения равен 5—10 нг/мл, а при концентрации ~70 нг/мл модуляция иммуноспецифического сигнала составляет 50% от максимальной. Как и ожидалось, интенсивность окраски полоски сравнения в исследованном интервале не зависит от концентрации морфия. Откладывая на графике отношение интенсивностей окраски индикатора и полоски сравнения, можно построить совершенно равноценную калибровочную кривую. Легко также заметить, что предел обнаружения, определяемый как концентрация вещества, при которой интенсивности окраски индикатора и полоски сравнения одинаковы, можно регулировать, увеличивая или уменьшая интенсивность окраски полоски сравнения. Таким образом можно изготовить индикаторные полоски

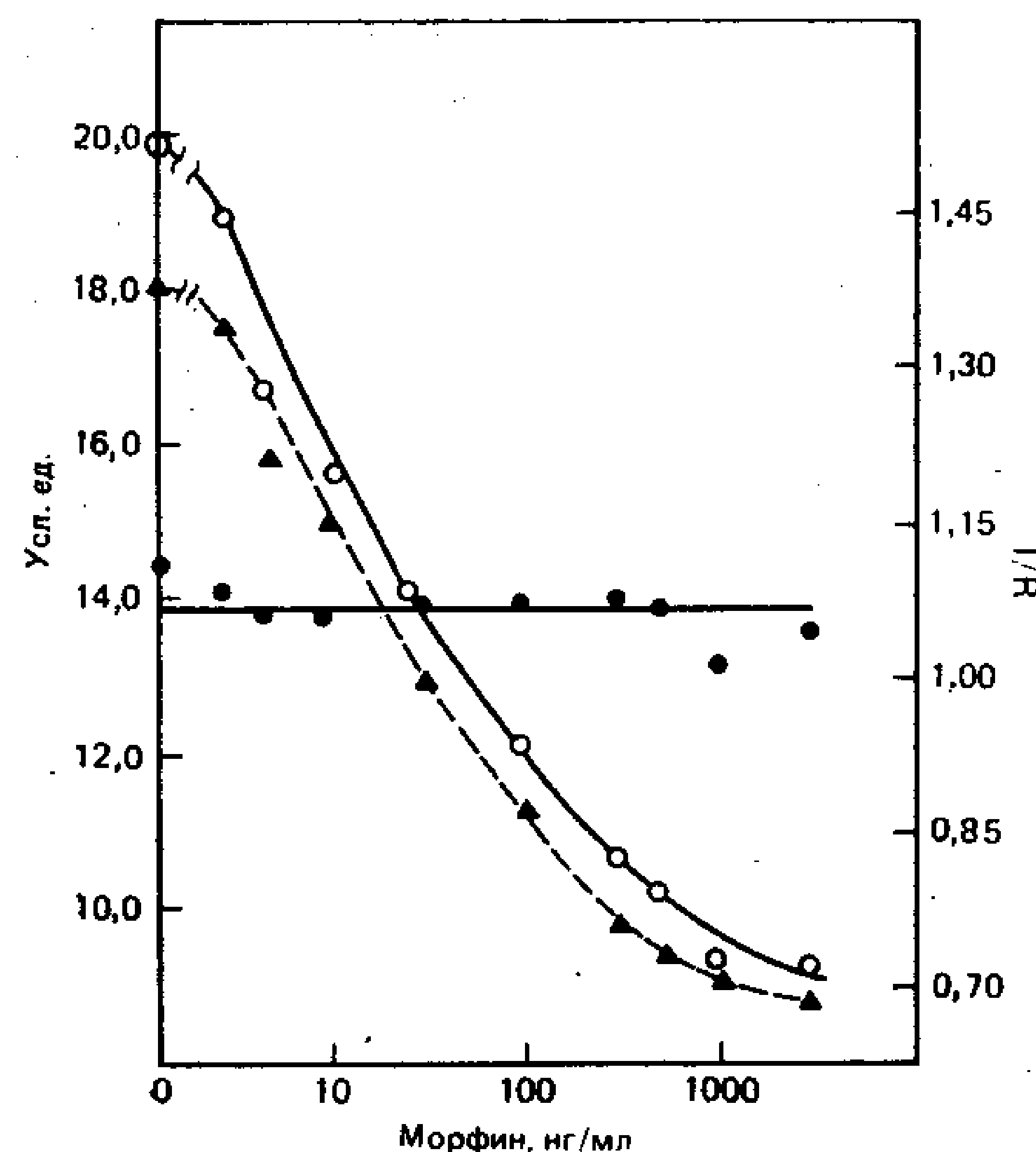


Рис. 10-5. Калибровочная кривая для определения морфия. Нормальные образцы мочи объединяли, добавляли к ним морфий в указанных концентрациях и анализировали, как описано в разделе «Материалы и методы». Представлены интенсивности окраски индикаторных полосок, содержащих антитела против морфия (светлые кружки), и полосок сравнения, содержащих антитела против пероксидазы (темные кружки), а также отношение I/R (темные треугольники). Публикуется с разрешения издательства (Litman et al., 1983).

для разных диапазонов концентраций определяемого вещества. Чувствительность анализа с помощью индикаторных полосок прямо пропорциональна степени сродства антител и обратно пропорциональна концентрации антител (неопубликованные данные). Такая зависимость справедлива и для других конкурентных методов.

Влияние времени проявления и температуры

Влияние времени проявления на интенсивность окраски индикатора, содержащего антитела против морфия, и полоски сравнения, содержащей антитела против пероксидазы, изучали при анализе положительных (20 мкг/мл) и отрицательных об-

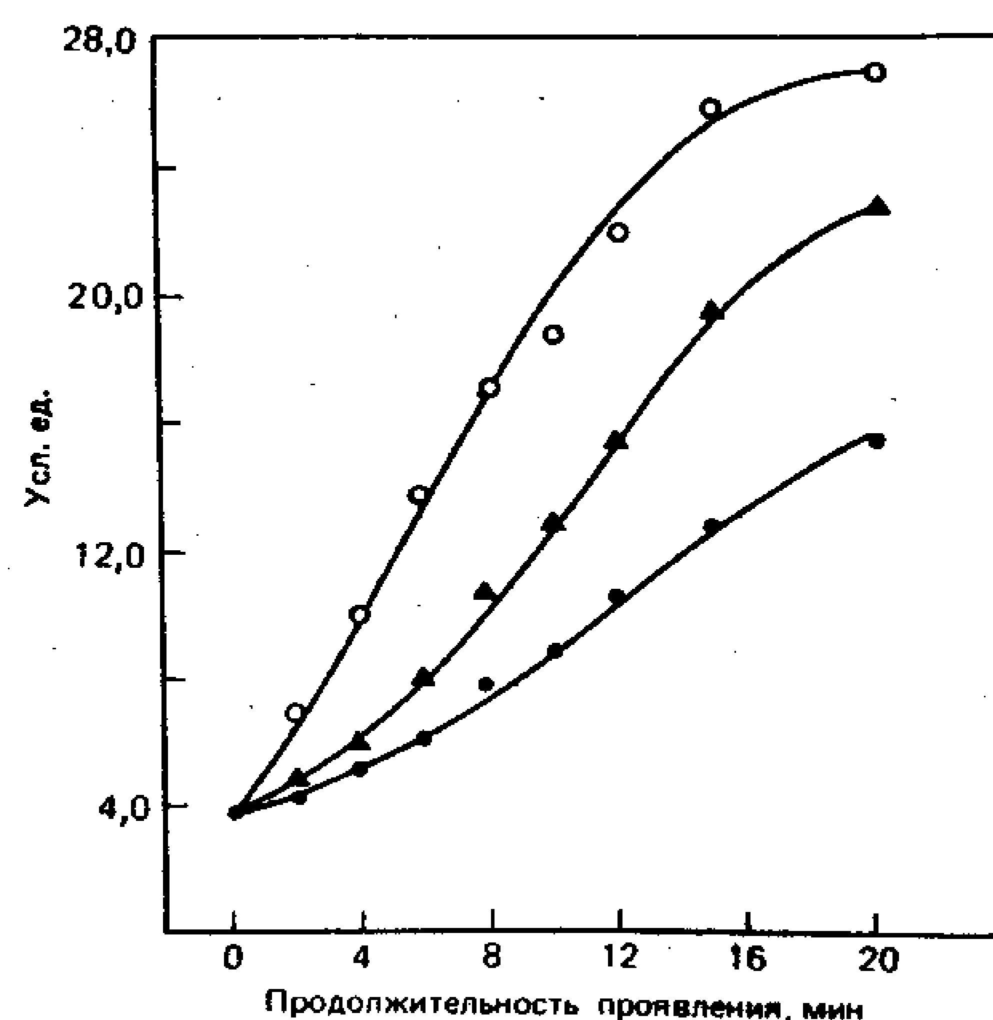
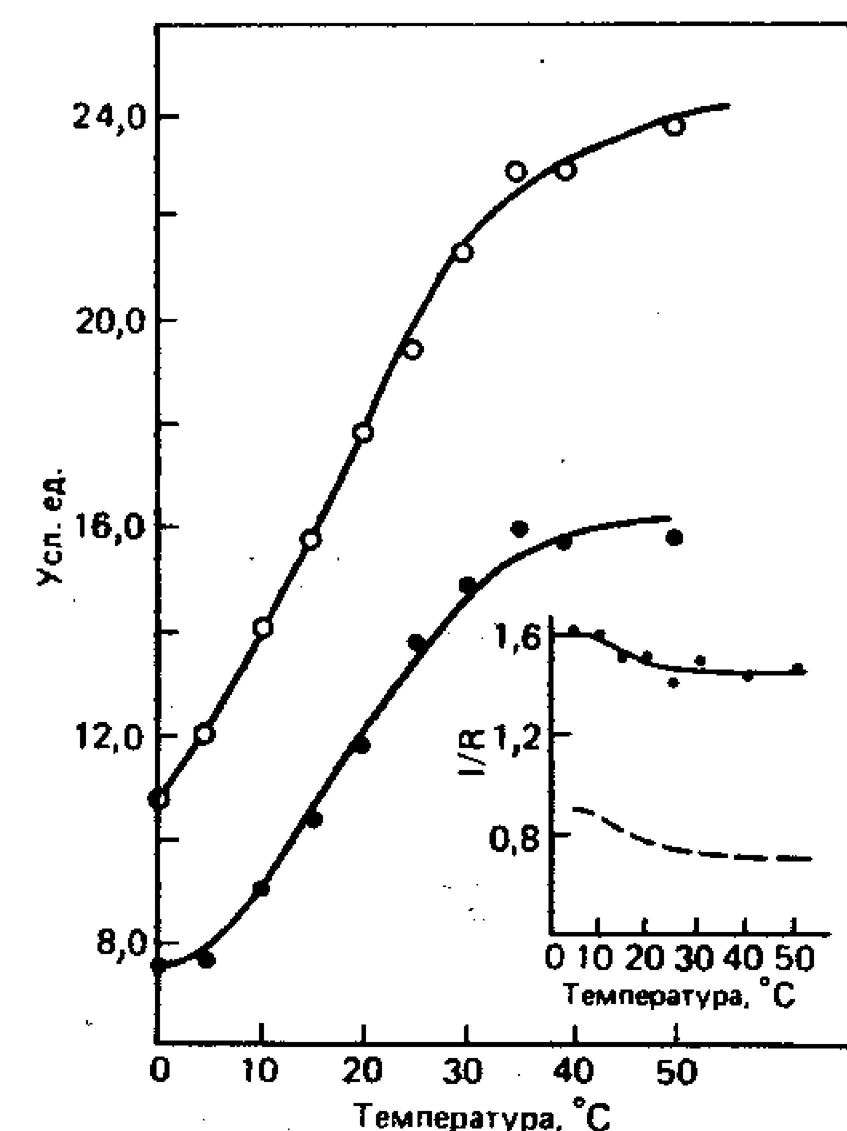


Рис. 10-6. Зависимость интенсивности окраски от продолжительности проявления. Индикаторные полоски инкубировали в отрицательных и положительных (20 мкг морфия/мл) образцах мочи и проявляли при 25 °C в течение указанных промежутков времени. Светлые кружки — индикаторные полоски в отрицательных образцах; темные кружки — индикаторные полоски в положительных образцах; темные треугольники — полоски сравнения. Публикуется с разрешения издательства (Litman et al., 1983).

Рис. 10-7. Зависимость интенсивности окраски от температуры проявителя. Индикаторные полоски (светлые кружки) и полоски сравнения (темные кружки) инкубировали сначала в образцах мочи, не содержащих морфия, а затем в проявителе в течение 10 мин при указанных температурах. *На врезке*: отношение интенсивностей окраски индикаторной полоски и полоски сравнения (I/R) при инкубации в отрицательных образцах мочи (сплошная линия) и образцах, содержащих морфий (20 мг/л) (прерывистая линия), с последующей инкубацией в проявителе при указанных температурах.



разцов мочи (рис. 10-6). Полученные данные свидетельствуют о сходном характере изменения окраски со временем у этих двух полосок. Количественные соотношения интенсивностей тоже не изменялись в течение изученного интервала времени: в случае отрицательных образцов окраска индикаторной полоски всегда была более интенсивной по сравнению с полоской сравнения ($I/R > 1,0$), а в случае положительных образцов она всегда была менее интенсивной ($I/R \leqslant 1,0$).

Влияние температуры на формирование окраски показано на рис. 10-7. Интенсивность окраски индикаторной полоски и полоски сравнения возрастает при повышении температуры от 0 до 50 °C. Влияние температуры на отношение I/R для положительных и отрицательных образцов мочи выражено значительно слабее (*врезка* на рис. 10-7). При этом по отношению I/R можно четко отличить положительные образцы ($I/R \leqslant 1,0$) от отрицательных ($I/R > 1,0$) во всем изученном интервале температур.

Помехи со стороны образцов и влияние основных компонентов образцов

Аскорбат представляет собой распространенный ингибитор пероксидазы, концентрация которого в биологических жидкостях у разных людей может изменяться в широких пределах. Влияние аскорбата на цветную индикаторную реакцию и реакцию сравнения изучали как модель помех, создаваемых образцами (рис. 10-8). Хотя с увеличением концентрации аскорбата интенсивность окраски индикаторной полоски и полоски сравнения уменьшается, влиянием ингибитора на отношение I/R прак-

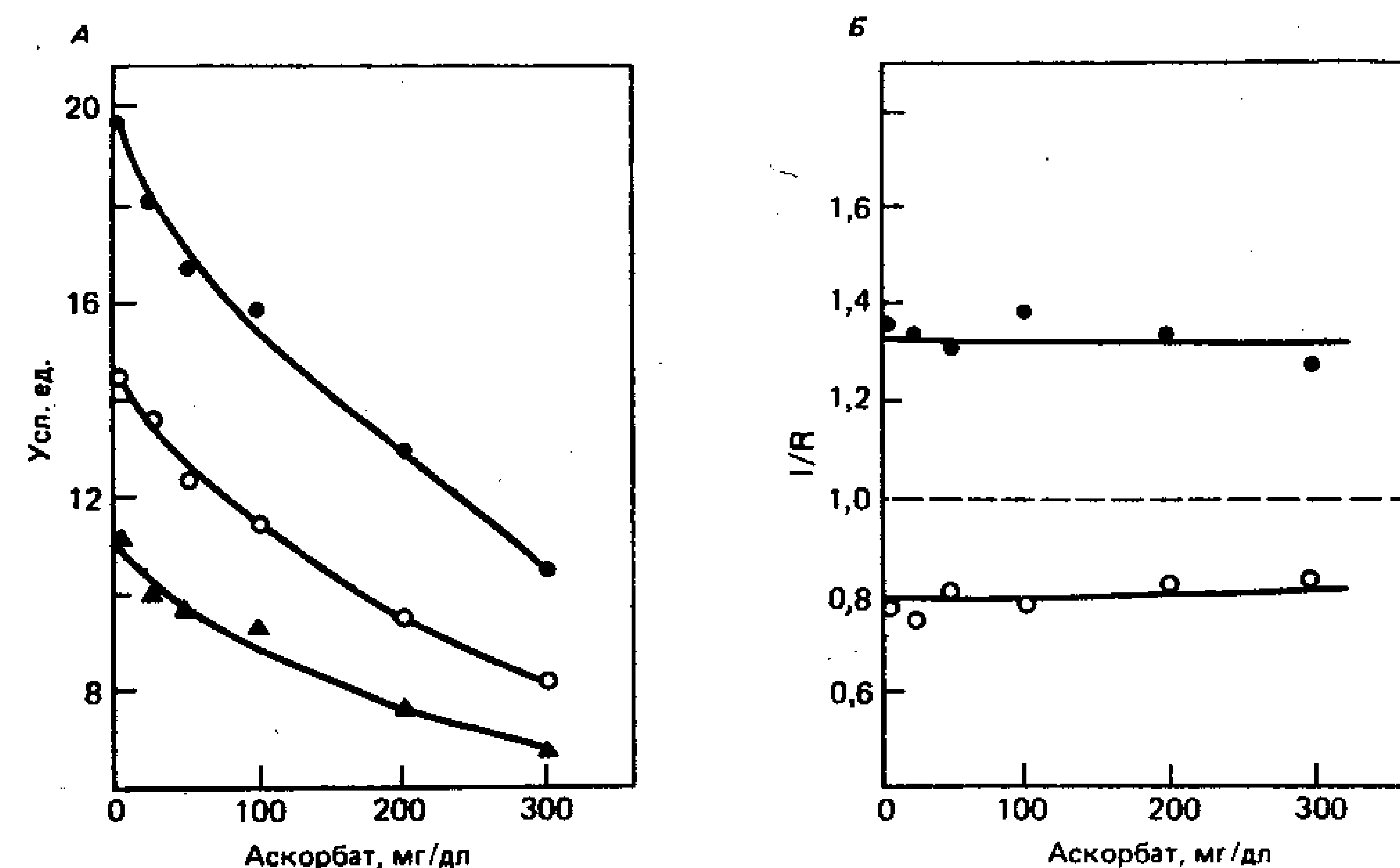


Рис. 10-8. Помехи со стороны образцов на примере влияния аскорбата на интенсивность окраски. Индикаторные полоски инкубировали в объединенных отрицательных или положительных (500 мг морфия/л) образцах мочи, содержащих аскорбат в указанных концентрациях, и затем проявляли, как описано в разделе «Материалы и методы». *А*. Интенсивность окраски полоски сравнения (светлые кружки) и индикаторной полоски для отрицательных (темные кружки) и положительных (темные треугольники) образцов. *Б*. Отношение I/R для отрицательных (темные кружки) и положительных (светлые кружки) образцов мочи. Публикуется с разрешения издательства (Litman et al., 1983).

тически можно пренебречь (рис. 10-8, *Б*). При концентрации аскорбата, снижающей интенсивность окраски примерно на 50%, по отношению I/R можно уверенно различать положительные и отрицательные образцы.

Для изучения влияния основных компонентов образцов анализировали мочу до и после прибавления морфия (500 нг/мл). Результаты представлены в виде гистограмм интенсивностей окраски (рис. 10-9, *А*) и отношений I/R (рис. 10-9, *Б*). Некоторые отрицательные образцы, содержавшие, как потом выяснилось, много аскорбата, ошибочно были приняты за положительные при оценке абсолютной интенсивности окраски, но они были правильно идентифицированы как отрицательные на основании отношения I/R. Сравнивая две гистограммы, легко заметить, что при использовании отношений I/R области, соответствующие положительным и отрицательным образцам, не перекрываются, а разброс результатов внутри каждой области уменьшается.

Воспроизводимость и достоверность анализа

Данные, представленные на рис. 10-9, отражают воспроизводимость анализа с помощью индикаторных полосок. Стандартное отклонение измерений намного выше для разных образцов

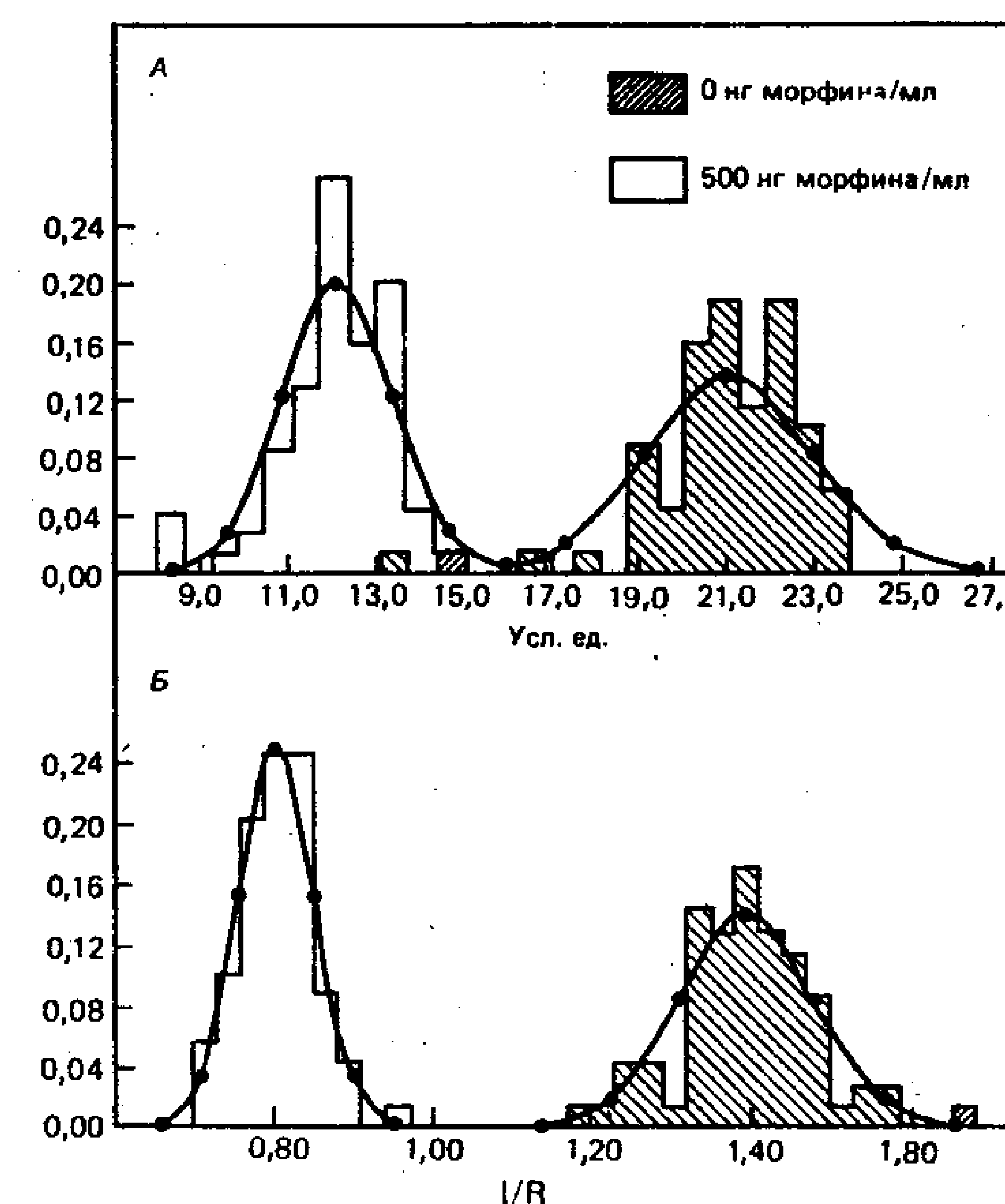


Рис. 10-9. Разброс значений аналитического сигнала для отдельных образцов мочи, содержащих морфий (500 мг/л) и не содержащих его. Данные представлены в условных единицах (усл. ед.) для индикаторной полоски (*А*) и в виде отношения I/R (*Б*). По оси ординат отложена доля общего числа образцов. Публикуется с разрешения издательства (Litman et al., 1983).

(1,8 усл. ед.), чем для разных полосок (0,6 усл. ед.). Как уже говорилось, разброс результатов от образца к образцу можно значительно снизить, если использовать отношение I/R. Например, на рис. 10-9 расстояние между областями положительного и отрицательного сигналов при использовании отношения I/R составляет ~9 стандартных отклонений, а при использовании абсолютных значений интенсивности окраски — только ~6 стандартных отклонений.

Клиническую достоверность метода оценивали по корреляции с традиционными лабораторными методами. Образцы мочи ($n=71$) пациентов наркологической клиники анализировали с помощью индикаторных полосок и с помощью набора «EMIT[R] Opiate Assay» фирмы Syva (Schneider et al., 1973). Предел обнаружения в методе анализа с помощью индикаторных полосок составлял 30 нг морфия/мл. Из 53 образцов, классифицированных как положительные на основании реакции с индикаторными полосками, 52 образца (98%) дали положительный ответ и при испытании методом EMIT. Ни один образец не был ошибочно назван отрицательным. В том единственном случае, когда положительный результат анализа с помощью индикаторных полосок не был подтвержден методом EMIT, отношение I/R соответствовало концентрации морфия 40—60 нг/мл, что значительно ниже предела обнаружения для EMIT-анализа. Очевидно, что клинические испытания должны быть продолжены, однако

уже на основании представленных здесь данных можно говорить об отличной корреляции с существующими методами и о клинической достоверности нового метода.

Обсуждение

Индикаторные полоски с внутренним стандартом удовлетворяют большинству требований, предъявляемых к методам качественного анализа вне лаборатории. Гомогенная система детектирования позволяет исключить стадии разделения; она удобна с точки зрения подготовки реагентов, которые используют в виде одной сухой полоски и одного жидкого проявителя. Применение внутреннего стандарта компенсирует многие факторы окружающей среды и делает анализ малочувствительным к флуктуациям температуры, помехам со стороны образцов, нестойкости фермента и ошибкам в измерении времени. Метод, вероятно, не потребует специального обучения персонала, так как анализ выполняется без применения пипеток, без точного контроля времени и без измерения оптической плотности растворов.

Скоростной иммуноанализ с помощью ультразвука

Во многих твердофазных методах скорость иммуноанализа лимитируется кинетикой связывания высокомолекулярного антигена или ферментного конъюгата с иммобилизованной фазой. Медленное связывание обусловлено, по-видимому, ограниченностью диффузии и массопереноса через границу раздела жидкость — твердое вещество. Мы изучили применение ультразвука для ускорения связывания высокомолекулярного антигена с иммобилизованными антителами в методе качественного иммуноанализа хориогонадотропина человека (ХГТЧ) с помощью индикаторных полосок (Chen et al., 1984). ХГТЧ представляет собой гликопротеиновый гормон, состоящий из двух субъединиц (α и β). Он был выбран в качестве модельного белка потому, что служит очень удобным индикатором беременности.

Принцип и методика анализа

Мы предложили иммуноанализ с помощью индикаторных полосок, построенный по типу двухцентрового сэндвич-метода (Maiolini, Masseyeff, 1975) с системой детектирования на основе сопряженных ферментативных реакций (рис. 10-10). Поверхность индикаторной полоски покрыта глюкозооксидазой, иммобилизованной на хроматографической бумаге Whatman 1С совместно с моноспецифическими антителами против α-субъеди-

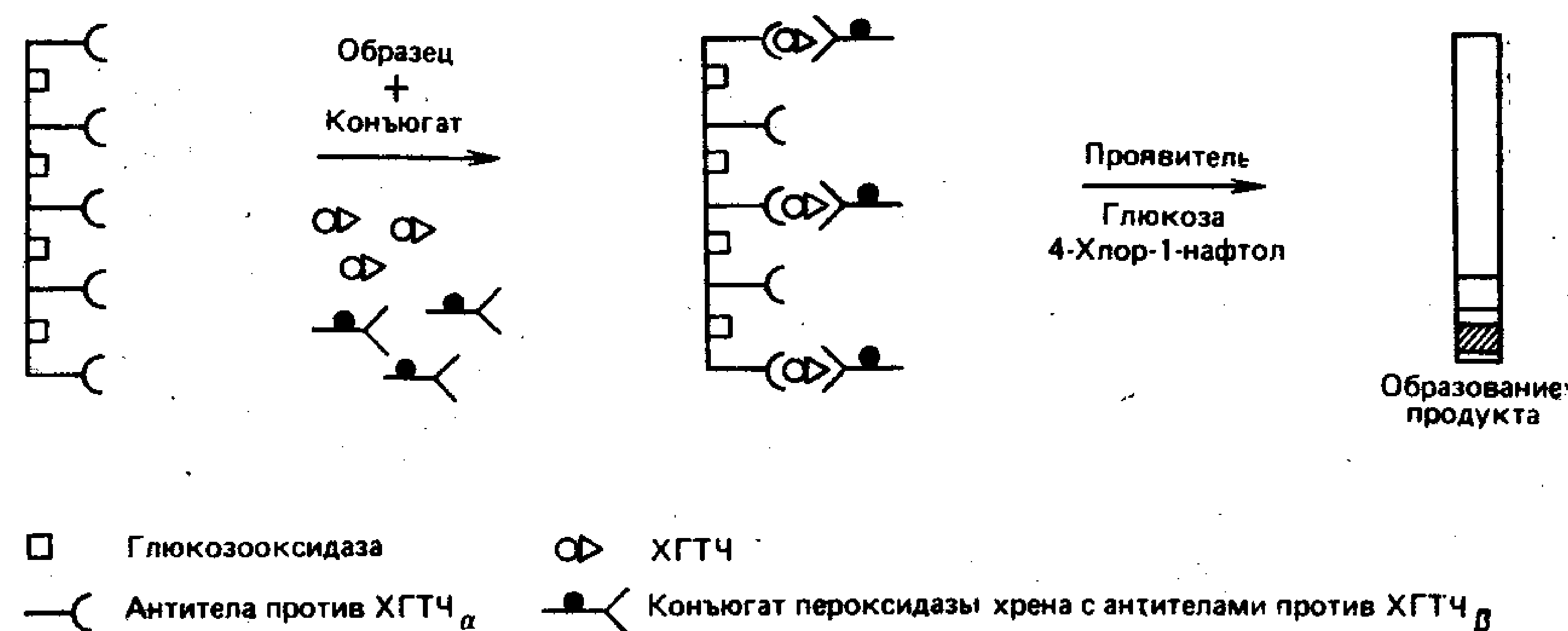


Рис. 10-10. Иммуноферментный анализ ХГТЧ с помощью двухцентрового сэндвич-метода. Публикуется с разрешения издательства (Chen et al., 1984).

ницы ХГТЧ. Раствор содержит иммуноспецифичный генератор сигнала — конъюгат пероксидазы с моноклональными антителами против β-субъединицы ХГТЧ.

Методика анализа предусматривает смешивание образца с ферментным конъюгатом, погружение индикаторной полоски в полученную смесь, инкубацию в течение 5 мин при воздействии ультразвуком и проявление с помощью цветных реакций в течение 10 мин (см. раздел «Материалы и методы»). При первой инкубации антиген одновременно связывается с иммобилизованными антителами и с конъюгатом антител и фермента. Окрашивание в результате проявления происходит по тому же механизму, что и в описанном выше анализе морфия. Однако в отличие от этого конкурентного анализа интенсивность окраски в двухцентровом сэндвич-методе пропорциональна концентрации антигена.

Влияние ультразвука на связывание ХГТЧ с иммобилизованными антителами

Выяснение роли ультразвука мы начали с изучения зависимости скорости связывания ХГТЧ с индикаторной полоской от акустической мощности (рис. 10-11). На индикаторные полоски воздействовали ультразвуком разной мощности в течение 10 мин в присутствии ^{125}I-ХГТЧ (10 МЕ/л, или 1нг/мл). Было найдено, что количество связавшегося ^{125}I-ХГТЧ прямо пропорционально акустической мощности.

Затем мы изучили влияние ультразвука на кинетику связывания при различных концентрациях антигена. Индикаторные полоски инкубировали в растворах, содержащих ^{125}I-ХГТЧ (1, 10, 100 и 1000 МЕ/л), в течение указанных промежутков вре-

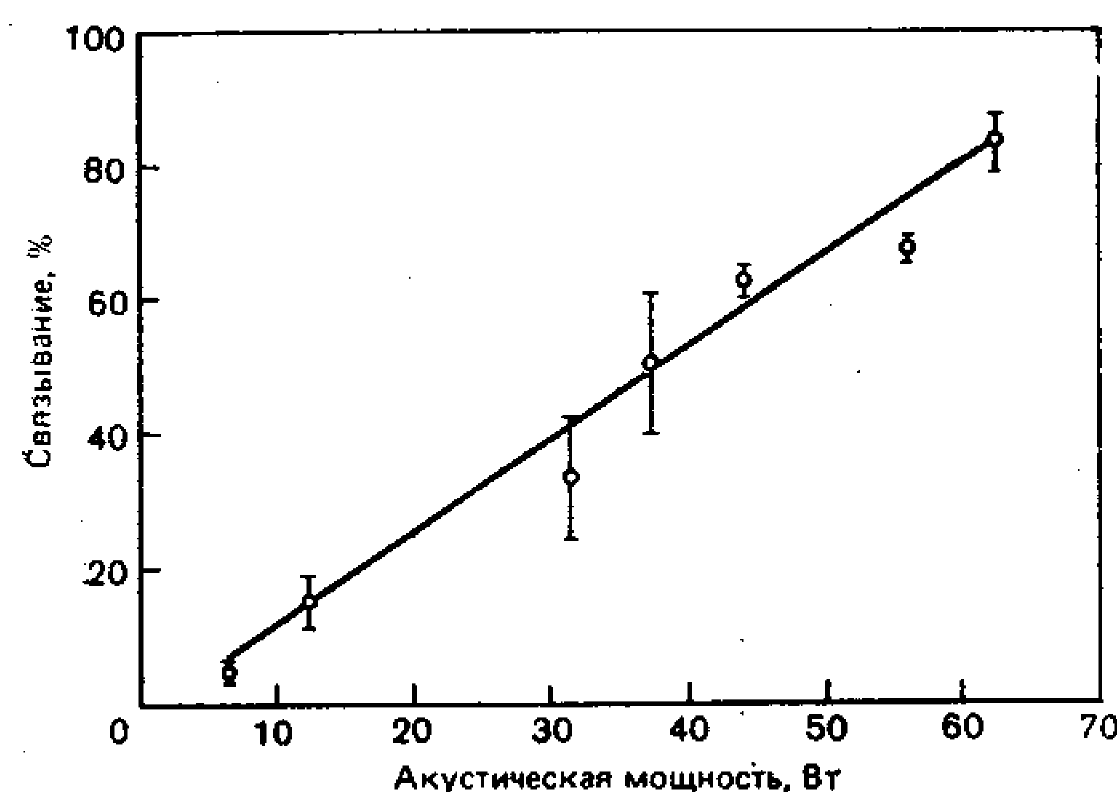


Рис. 10-11. Зависимость связывания ^{125}I-ХГТЧ с иммобилизованными антителами от акустической мощности. Мощность изменяли регулировкой напряжения, подаваемого на ультразвуковой генератор. Отрезки показывают разброс данных при повторных измерениях. Публикуется с разрешения издательства (Chen et al., 1984).

мени (при воздействии ультразвуком или в обычных условиях). Данные, полученные при концентрации ХГТЧ 1 МЕ/л (0,1 нг/мл) и характерные для всей серии опытов, с очевидностью показывают, что ультразвук способен резко ускорять связывание антигена с индикаторной полоской (рис. 10-12). При обработке ультразвуком почти весь иммунореактивный ХГТЧ адсорбируется за первые 20 минут, тогда как в обычных условиях насыщение не достигается даже за 150 ч. Как видно из табл. 10-1, константы скорости связывания при воздействии ультразвуком и без него имеют первый порядок и по существу не зависят от концентрации антигена. В среднем ультразвук ускоряет связывание антигена в ~500 раз. Аналогичные результаты получены для связывания конъюгата с поверхностями, на которых предварительно был адсорбирован ХГТЧ (данные не представлены).

Сравнительное изучение влияния различных факторов на твердофазное связывание

При изучении скорости связывания антигена и конъюгата с антителами в растворе мы использовали примерно такие же

Таблица 10.1. Влияние ультразвука на константы скорости связывания[1]

ХГТЧ, МЕ/л	k, $c^{-1}\cdot 10^6$	
	без ультразвука	при воздействии ультразвука
1	5,3	2100
10	4,4	1500
100	5,3	4500
1000	6,1	2500
Среднее значение	5,3	2700
Стандартное отклонение	0,7	1300

[1]) Константы скорости определяли из графиков зависимости $\ln(C_t/C_0)$ от t.

концентрации реагентов, что и в анализе с помощью индикаторных полосок. Нам не удалось обнаружить влияния ультразвука на скорость связывания или на количество связавшегося антигена при проведении реакции в растворе (Chen et al., 1984). Попытки заменить ультразвук более привычной термической или механической обработкой оказались практически безуспешными (табл. 10-2). Повышение температуры влияет на скорость связывания лишь незначительно, а воздействие на индикаторную полоску ультразвуком перед реакцией с антигеном не приводит к заметному изменению скорости связывания по сравнению с контрольным опытом. Интенсивное механическое встряхивание ускоряет связывание примерно в 50 раз, однако перемешивание под действием ультразвука более эффективно на порядок величины.

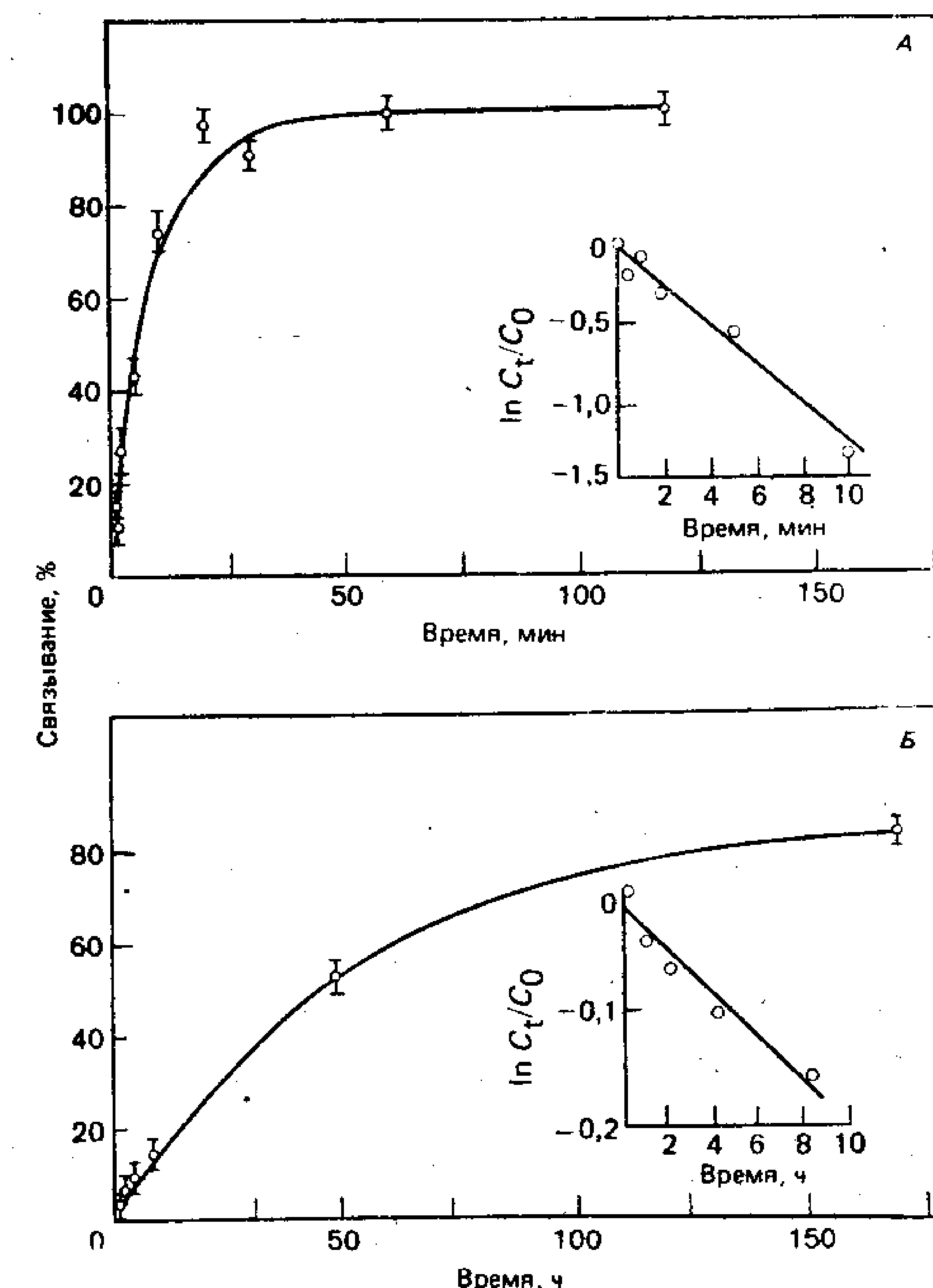


Рис. 10-12. Кинетика связывания ^{125}I-ХГТЧ на полосках с иммобилизованными антителами при воздействии ультразвука (*А*) и без такого воздействия (*Б*). Отрезки показывают разброс данных при повторных измерениях. На врезках представлены графики зависимости $\ln(C_t/C_0)$ от t, по которым определяли константы скорости первого порядка. Публикуется с разрешения издательства (Chen et al., 1984).

Калибровочная кривая для определения ХГТЧ; клинический анализ

Для построения калибровочной кривой зависимости интенсивности окраски от концентрации ХГТЧ использовали объединенные образцы мочи мужчин с добавкой очищенного гормона (рис. 10-13). Нижний предел обнаружения равен 10 мМЕ/мл; при больших концентрациях, превышающих 1000 мМЕ/мл, на кривой появляется серповидный загиб. Уменьшение сигнала при высоких концентрациях ХГТЧ связано с ограниченной емкостью подложки и большим молярным избытком антигена по отношению к ферментному конъюгату в реакционной смеси. Серпо-

Таблица 10-2. Зависимость константы скорости связывания от способа обработки[1]

Способ обработки	k, $c^{-1} \cdot 10^6$
—	5
Предварительное воздействие ультразвуком	5
Нагревание (43 °С)	8
Встряхивание с помощью вортекса	300
Воздействие ультразвуком	2700

[1]) Константы скорости определяли при концентрации ХГТЧ 100 МЕ/л.

видный загиб кривой можно устранить, увеличив концентрацию конъюгата или удалив избыток антигена перед прибавлением конъюгата. Несмотря на серповидную форму кривой, анализ позволяет надежно различать положительные и отрицательные образцы даже при концентрациях ХГТЧ выше $2{,}5 \cdot 10^5$ мМЕ/мл.

Для предварительной оценки клинической достоверности ультразвукового метода с применением индикаторных полосок результаты небольшой серии анализов мочи (полученной от 11 мужчин и 65 беременных женщин) сравнили с результатами метода ELISA («Tandem-E[R]», фирма Hybritech, Inc.). Предел обнаружения для обоих методов составлял 25 мМЕ/мл. Корреляция полученных данных оказалась превосходной. Оба метода позволили идентифицировать все «мужские» образцы как отрицательные и 55 из 65 «женских» — как положительные. Вероятно, в десяти «женских» образцах, давших отрицательный ответ при анализе обоими методами, концентрация ХГТЧ была ниже 25 мМЕ/мл. Девять из десяти образцов с ложной отрицательной реакцией были собраны до ожидаемого начала менструации, а десятый принадлежал женщине с внематочной беременностью.

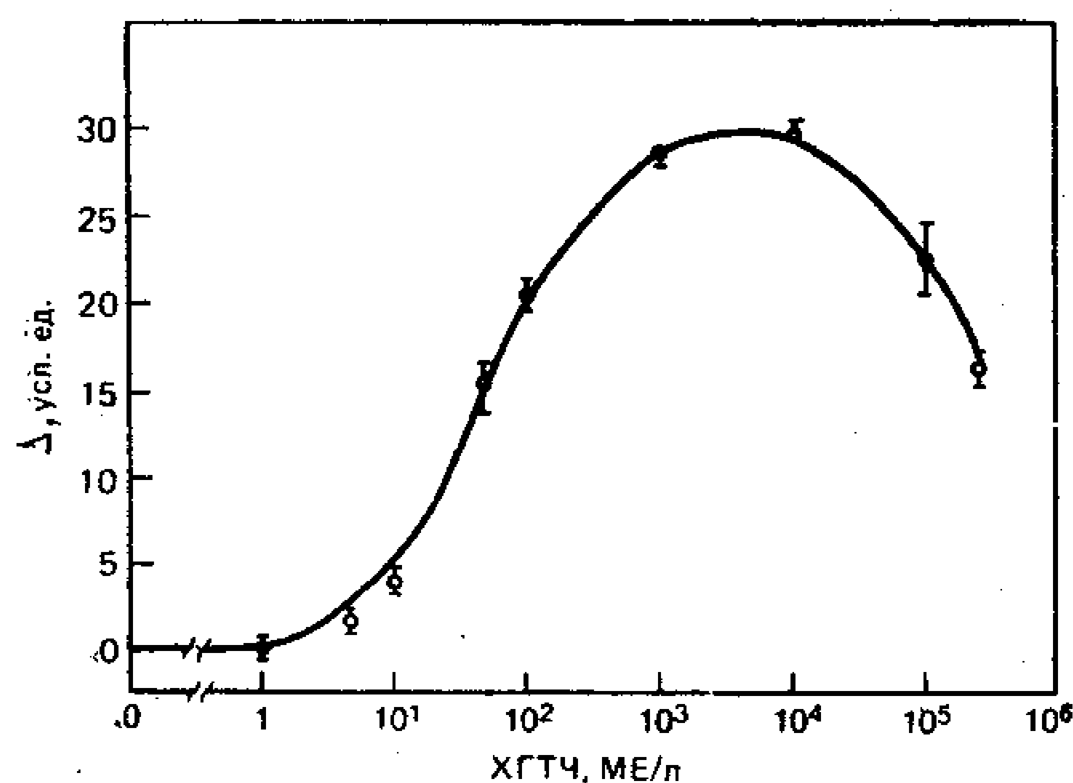


Рис. 10-13. Калибровочная кривая для определения ХГТЧ. Образцы нормальной мочи объединяли, добавляли очищенный ХГТЧ в указанных концентрациях и анализировали, как описано в разделе «Материалы и методы». Отрезки показывают разброс данных при повторных измерениях. Публикуется с разрешения издательства (Chen et al., 1984).

Обсуждение

Данные, представленные в этом разделе, в целом подтверждают представления об ускорении переноса белков через границу жидкость — твердое вещество при обработке ультразвуком. Известно сходное влияние ультразвука на гетерогенный катализ в системах, содержащих иммобилизованные ферменты (Berezin et al., 1977). Маловероятно, чтобы ультразвук необратимо изменял доступность или степень сродства иммобилизованных антител, однако нельзя исключить кратковременного уменьшения пространственных затруднений вследствие периодического возмущения твердого носителя. Наиболее удовлетворительное объяснение действия ультразвука состоит в том, что он вызывает эффективное микроперемешивание за счет схлопывания кавитационных пузырьков и создания в жидкости потоков. Считают, что такое перемешивание уменьшает толщину неподвижного слоя растворителя, прилегающего к твердым поверхностям, и тем самым благоприятствует диффузии и массопереносу через границу раздела фаз (Борисов, Статников, 1966). По-видимому, этот эффект имеет всеобщий характер и может быть использован в других методах, основанных на твердофазном связывании, таких, как метод ELISA в платах для микротитрования, радиоиммунологический анализ, анализ ДНК и рецепторов.

Ферментативная иммунохроматография — неинструментальный метод количественного анализа

Очевидно, что неинструментальные количественные методы очень удобны в тех случаях, когда решающее значение приобретают портативность оборудования и скорость определения. Этим требованиям не удовлетворяет большинство методов иммуноферментного анализа, в которых иммуноспецифический сигнал связан с активностью ферментной метки. Поскольку ферментативные реакции зависят от времени и температуры, методы, основанные на измерении активности, обычно требуют специальной калибровки, точного контроля времени и температуры. Все это в совокупности с трудностью визуального определения малых изменений поглощения или отражения неизбежно приводит к использованию довольно сложных приборов.

Мы разработали принципиально иной подход, в котором иммуноспецифический сигнал связан не с активностью фермента, а с положением ферментной метки на индикаторной полоске (Zuk et al., 1985). Предложенный нами ферментативный иммунохроматографический метод, как будет показано ниже, мало зависит от температуры, точности измерения времени, а также от помех со стороны образцов. Мы обсудим характеристики визуального анализа теофиллина в цельной крови.

Принцип и методика анализа

Ферментативный иммунохроматографический метод, сочетающий в себе многие особенности анализа с применением «ферментных каналов» и анализа на основе иммунокапиллярной миграции (Glad, Grubb, 1978), позволяет визуально определять количество антигена по высоте окрашенного фронта на полоске иммунореактивной бумаги. Набор для анализа состоит из трех основных компонентов: 1) сухой бумажной индикаторной полоски, содержащей иммобилизованные антитела; 2) жидкого ферментного реагента, содержащего глюкозооксидазу и конъюгат пероксидазы с теофиллином; 3) раствора проявителя, состоящего из ферментных субстратов — глюкозы и 4-хлорнафтола (рис. 10-14).

При выполнении анализа образец, содержащий антиген, добавляют к ферментному реагенту и какое-то время перемешивают. Затем край индикаторной полоски погружают в полученную смесь ферментного реагента с раствором антигена и дают жидкости подняться по полоске под действием капиллярных сил. На этом этапе полоска поглощает ограниченное и воспроизводимое количество раствора. Антиген и ферментный конъюгат, перемещаясь по полоске, иммунологически связываются с иммобилизо-

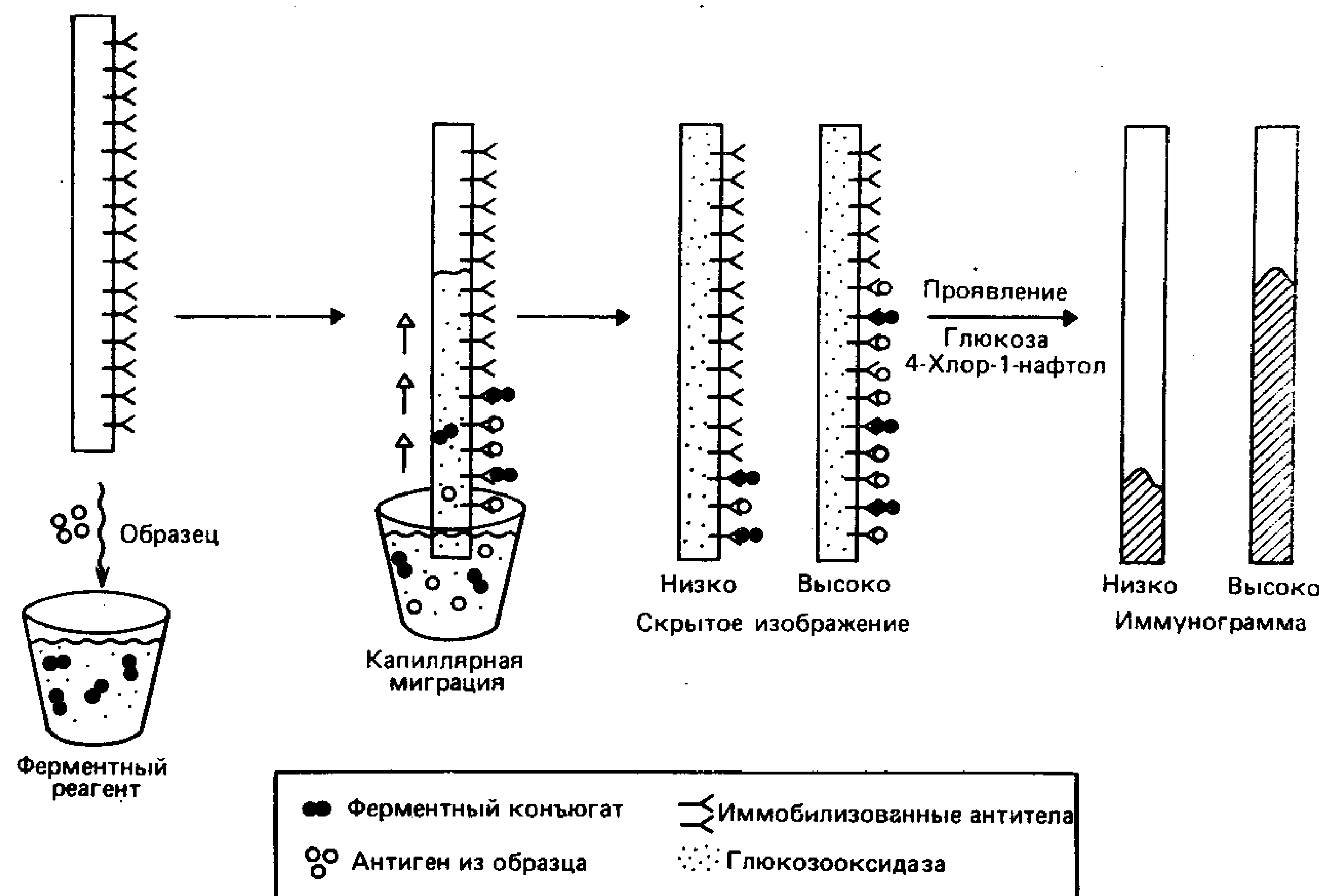


Рис. 10-14. Схема ферментативного иммунохроматографического анализа с применением индикаторных полосок. Публикуется с разрешения издательства (Zuk et al., 1985).

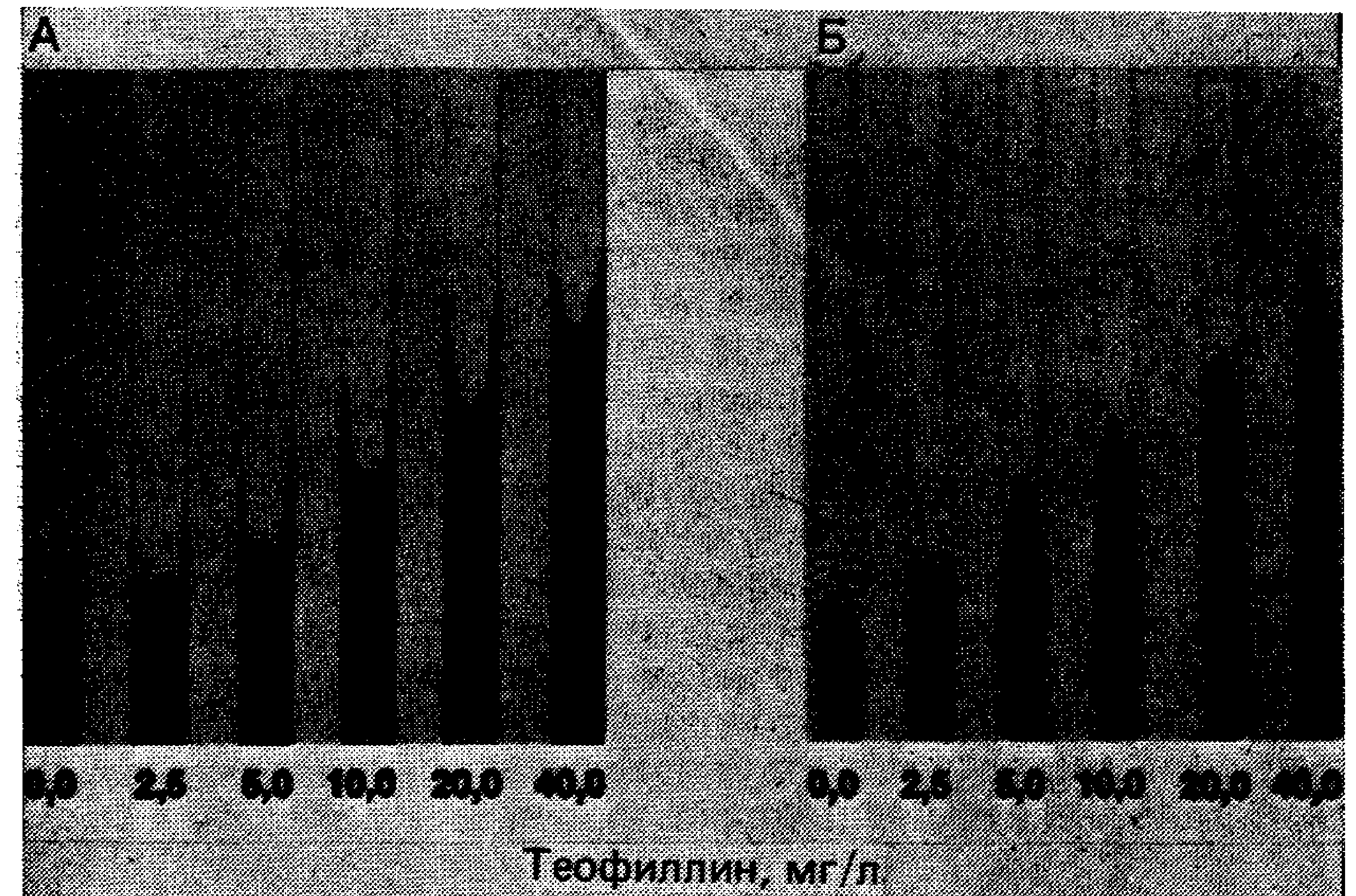


Рис. 10-15. Остроконечность цветного фронта и краевые эффекты. Смешивали 12,5 мкл калибровочного образца сыворотки с 1 мл ферментного реагента и определяли теофиллин, как описано в разделе «Материалы и методы». *А*. Индикаторные полоски с прямыми краями. *Б*. Индикаторные полоски с зубчатыми краями. Здесь и на следующих рисунках указаны концентрации теофиллина в исходных, неразбавленных образцах. Публикуется с разрешения издательства (Zuk et al., 1985).

ванными на ней антителами. Глюкозооксидаза, содержащаяся в растворе, равномерно распределяется по всей длине полоски. Стадия капиллярной миграции, продолжающаяся 10 мин, приводит к получению скрытого изображения антигена и конъюгата на бумаге. Расстояние, на которое продвинулась метка, прямо пропорционально концентрации определяемого вещества.

По окончании этой стадии полоску целиком погружают в проявитель. Иммунологически связанный конъюгат пероксидазы катализирует окисление 4-хлорнафтола пероксидом водорода, выделяющимся в реакции глюкозы с O_2 под действием глюкозооксидазы. При этом образуется нерастворимый голубой продукт, прилипающий к полоске. Хотя пероксид водорода выделяется равномерно вдоль всей полоски, окрашенный продукт появляется только на тех участках, где локализован конъюгат пероксидазы с антигеном. Применение системы детектирования, основанной на сопряженных ферментативных реакциях, позволяет обходиться без сравнительно нестойких проявителей, содержащих пероксид водорода. Окраска формируется за 5 мин, при этом появляется цветная зона или «ракета» с остроконечным фронтом, высота которого зависит от концентрации антигена в образце (рис. 10-15).

Остроконечность фронта и краевые эффекты

Для обеспечения надежности и воспроизводимости неинструментальных методов важно, чтобы результаты считывались просто и однозначно. В иммунохроматографическом методе существенное значение для точности имеют однотипность и остроконечность окрашенного фронта. Одним из главных факторов, влияющих на качество фронта, является способ обрезки бумаги. Если края полоски обрезаны прямо, фронт приобретает форму мениска (рис. 10-15, *А*). По-видимому, это вызвано более быстрой капиллярной миграцией на краях бумаги. Если вырезать зубчатые края и таким образом увеличить путь, преодолеваемый капиллярным потоком, то можно не только устранить мениск, но и вызвать обратный эффект, т. е. получить фронт в форме ракеты (рис. 10-15, *Б*). Остроконечность фронта можно регулировать, изменяя размеры зубцов. При любой концентрации антигена фронт можно сделать таким, чтобы его положение воспроизводилось и легко считывалось.

Влияние концентрации антител на аналитический сигнал

Высота, на которую поднимаются при данной концентрации антиген и конъюгат, зависит от поверхностной плотности иммобилизованных антител, а также от соотношения скоростей связывания и капиллярной миграции антигена. Мы изучили влияние концентрации иммобилизованных антител на положение фронта при различных концентрациях теофиллина (рис. 10-16). Для любой заданной концентрации иммобилизованных антител путь, проходимый фронтом, монотонно и нелинейно возрастает

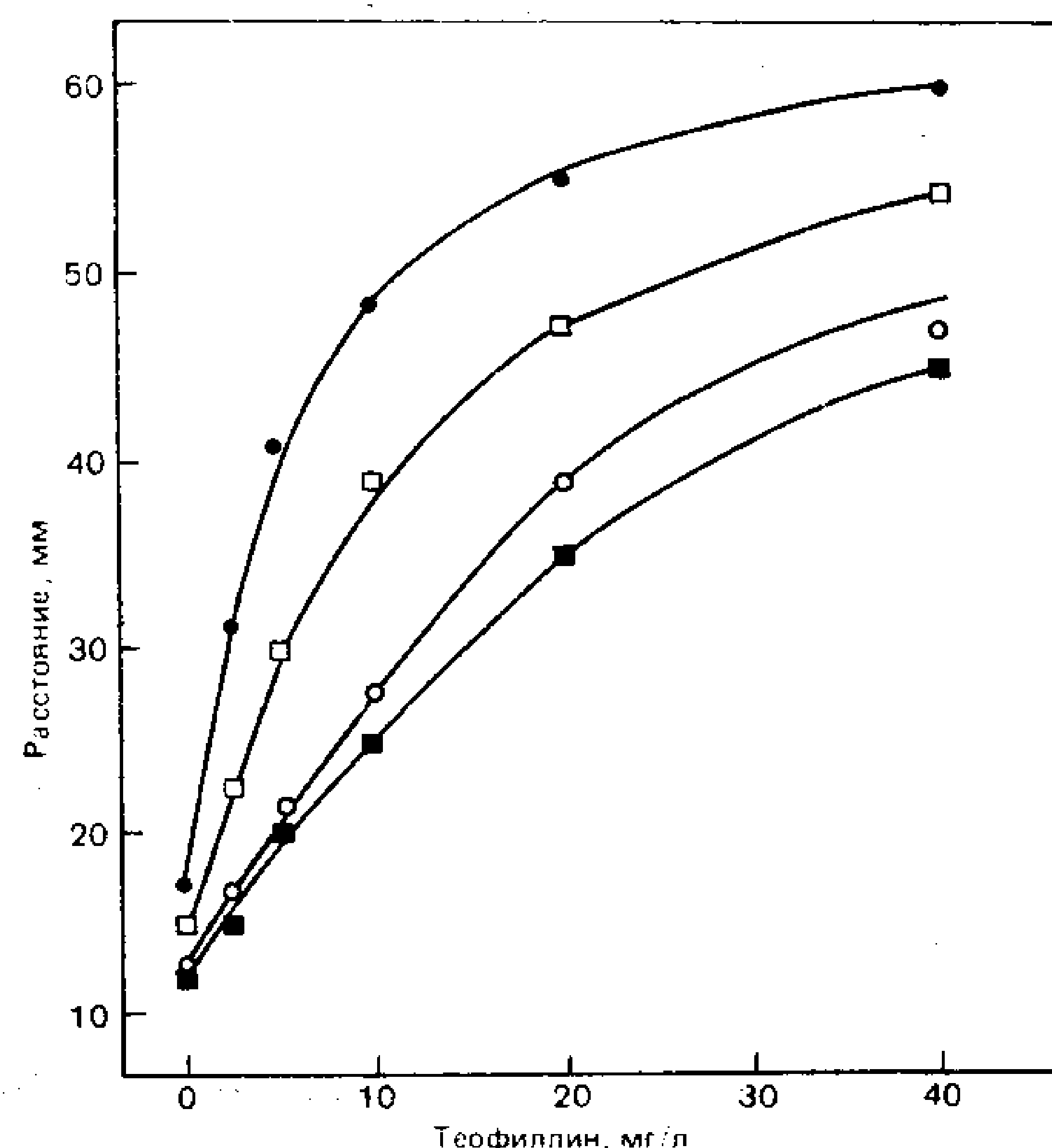


Рис. 10-16. Влияние поверхностной плотности антител на положение окрашенного фронта. С помощью индикаторных полосок с различным содержанием иммобилизованных антител анализировали объединенные образцы нормальной плазмы, содержащие теофиллин в указанных концентрациях. Смешивали 20 мкл плазмы и 1 мл ферментного реагента и выполняли анализ, как указано в разделе «Материалы и методы». Поверхностная плотность антител составляла 12 мкг/см² (темные кружки), 30 мкг/см² (светлые квадраты), 52 мкг/см² (светлые кружки) или 67 мкг/см² (темные квадраты). Публикуется с разрешения издательства (Zuk et al., 1985).

с увеличением концентрации антигена. Для любой заданной концентрации определяемого вещества расстояние миграции обратно пропорционально поверхностной плотности иммобилизованных антител. Зависимость аналитического сигнала от содержания антител, имеющая сходный характер в других конкурентных методах, поддается прогнозированию. Это позволяет предложить способ оптимизации анализа, состоящий в подборе соответствующих концентраций иммобилизованных антител для различных диапазонов концентраций антигена.

Влияние концентрации конъюгата

Мы изучили зависимость аналитического сигнала при определении теофиллина от концентрации конъюгата теофиллина с пероксидазой и от соотношения гаптен/фермент (рис. 10-17, *А* и *Б*). Калибровочные кривые для анализа теофиллина почти не зависят от концентрации конъюгата при ее изменении в четыре раза, а также от числа молекул гаптена, связанных с молекулой

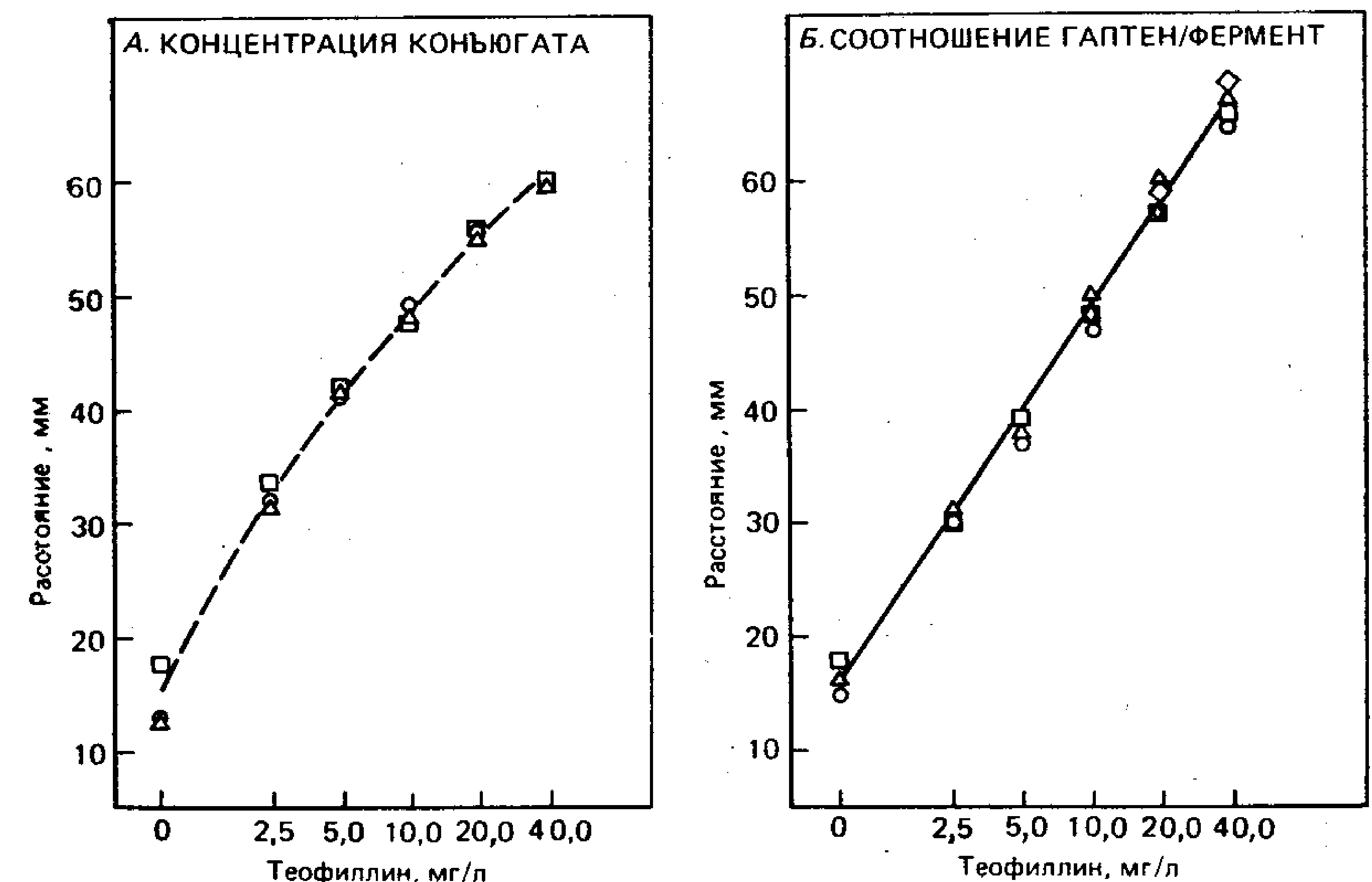


Рис. 10-17. Влияние соотношения гаптен/фермент и концентрации конъюгата на аналитический сигнал. *А*. Для анализов использовали по 20 мкл калибровочных образцов сыворотки, содержащих теофиллин. Ферментный реагент содержал конъюгат теофиллина с пероксидазой хрена: 0,1 (кружки), 0,2 (треугольники) или 0,4 (квадраты) мкг/мл (5,4 молекул гаптена на молекулу фермента). Анализы выполняли, как описано в разделе «Материалы и методы». *Б*. То же самое, что *А*, но ферментный реагент содержал конъюгаты (0,2 мкг/мл) разного состава: 5,9 (кружки), 8,0 (ромбы), 11,8 (треугольники) или 14,0 (квадраты) молекул гаптена на молекулу фермента. Публикуется с разрешения издательства (Zuk et al., 1985).

пероксидазы. Полученные результаты согласуются с тем, что антиген даже при наименьшей концентрации в растворе был в большом (семнадцатикратном) избытке по отношению к наибольшей из использованных концентраций конъюгата. Таким образом, конъюгат действует в основном как индикатор связанного антигена, а концентрация конъюгата влияет на расстояние миграции только при анализе отрицательных образцов.

Влияние продолжительности инкубации и температуры

Методы иммуноанализа, предназначенные для нелабораторного использования, должны требовать лишь минимальной калибровки или вовсе ее не требовать и должны давать надежные результаты при самых разных внешних условиях. Можно ожидать, что иммунохроматографический анализ мало чувствителен к продолжительности инкубации и температуре, поскольку количественное определение в этом методе не базируется на точном измерении ферментативной активности. Результаты, согласующиеся с этим предположением, были получены при построении калибровочных кривых для определения теофиллина при различных температурах (рис. 10-18). Как видно из рисунка, расстояние миграции существенно не зависит от температуры в интервале от 4 до 37 °С. В другой серии опытов (данные не представлены) варьировали время последовательной инкубации индикаторных полосок в ферментном реагенте и проявителе. Хотя при увеличении времени инкубации до 30 мин в каждом реагенте результаты количественного определения не изменяются, продолжительная инкубация приводила к получению расплывчатых окрашенных зон и снижению воспроизводимости. Вероятно, это обусловлено совместным влиянием диффузии и испарения растворителя.

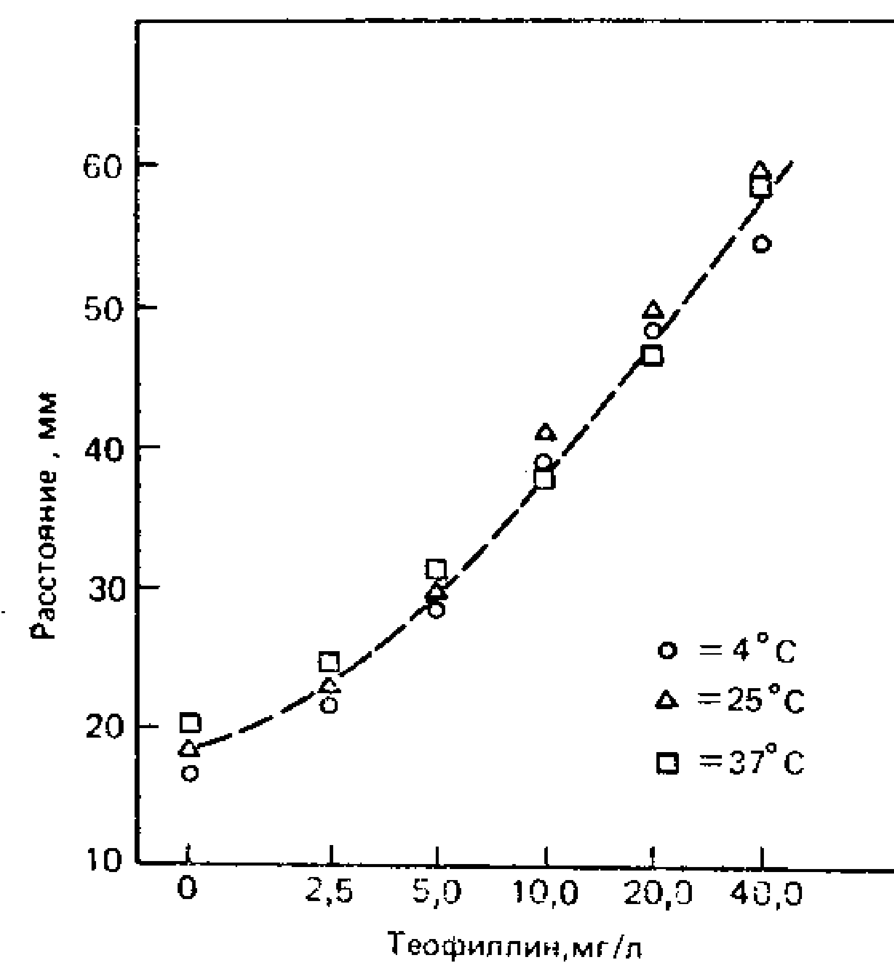


Рис. 10-18. Влияние температуры на аналитический сигнал. Анализировали по 20 мкл калибровочных образцов сыворотки, содержащих теофиллин, при 4 °С, 24 °С и 37 °С, как описано в разделе «Материалы и методы». Публикуется с разрешения издательства (Zuk et al., 1985).

Анализ цельной крови и влияние основных компонентов образцов

Для того чтобы свести к минимуму подготовку образцов и упростить методику определения, мы использовали для анализа вместо сыворотки или плазмы свежую цельную кровь. Было обнаружено, что эритроциты не повреждаются при суспендировании в ферментном реагенте, но при капиллярной миграции они образуют темную диффузную зону, покрывающую примерно 50% полоски (рис. 10-19, дорожки 1 и 2). Мы предотвращали миграцию эритроцитов добавлением к ферментному реагенту вещества, вызывающего их агрегацию, например агглютинина из проростков пшеницы (рис. 10-19, дорожки 3 и 4) или антител против эритроцитов (рис. 10-19, дорожки 5 и 6). В этом случае бумажные волокна эффективно задерживают слипшиеся эритроциты, образующие узкую зону в пределах нижних **10 мм** индикаторной полоски.

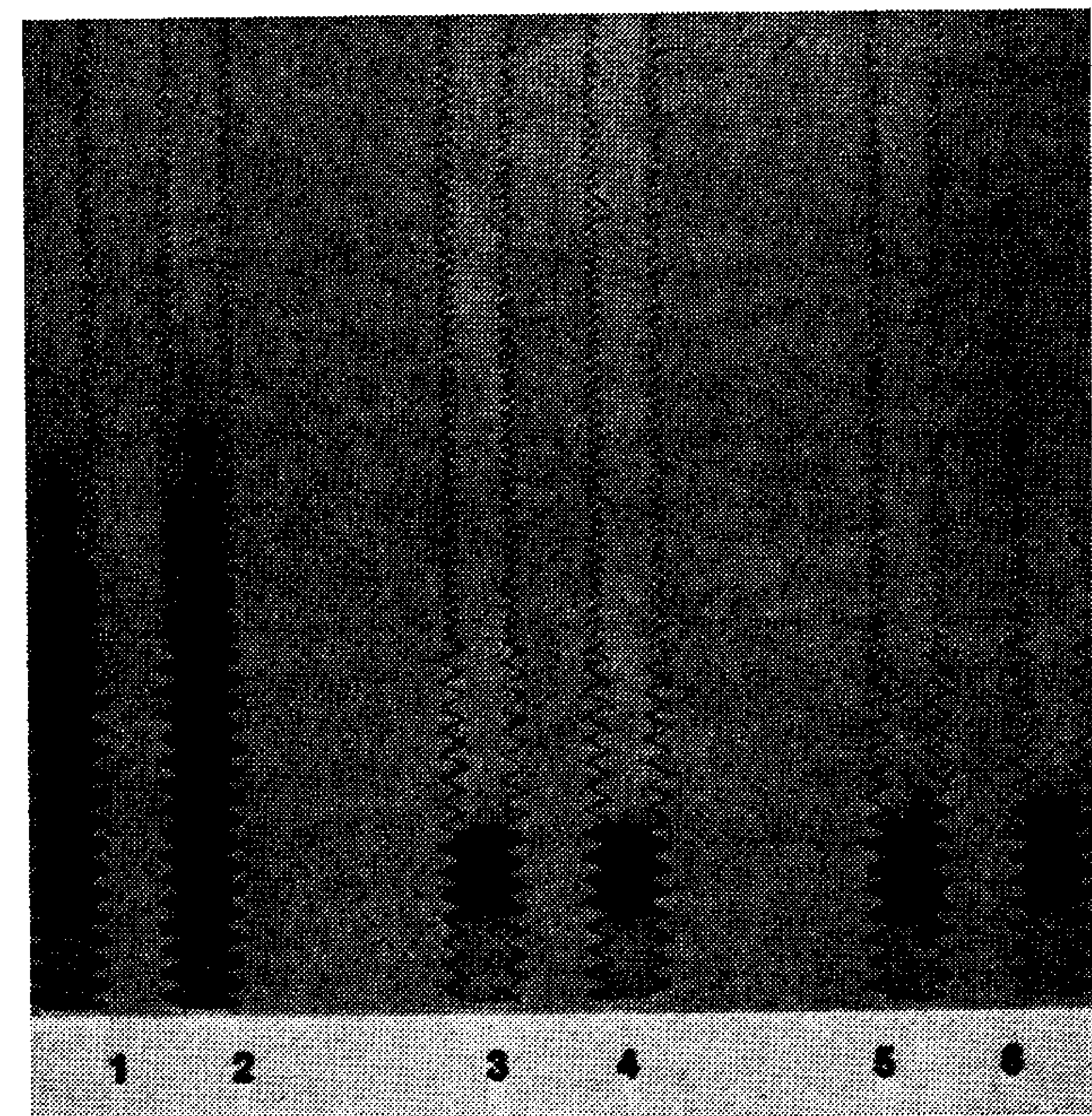


Рис. 10-19. Предотвращение миграции эритроцитов с помощью агентов, вызывающих агглютинацию. Показано расположение эритроцитов на индикаторных полосках после погружения в ферментный реагент, содержащий 2% цельной крови. Дорожки 1 и 2 — без агглютинирующих агентов; дорожки 3 и 4 — при добавлении агглютинина из проростков пшеницы (20 мкг/мл); дорожки 5 и 6 — при добавлении антител барана против эритроцитов человека (20 мкг/мл). Публикуется с разрешения издательства (Zuk et al., 1985).

Таблица 10-3. Влияние основных компонентов образцов на расстояние миграции[1]

Концентрация теофиллина	Буфер	Плазма	Кровь
0,0 мг/л			
Расстояние миграции, мм	18,4	19,1	18,8
S	0,8	0,6	0,5
V, %	4,2	3,0	2,9
2,5 мг/л			
Расстояние миграции, мм	30,7	31,0	31,1
S	0,6	0,6	1,1
V, %	2,0	2,1	3,5
5,0 мг/л			
Расстояние миграции, мм	36,2	36,7	36,1
S	0,7	0,7	0,9
V, %	1,6	1,5	1,6
10,0 мг/л			
Расстояние миграции, мм	43,5	43,7	43,1
S	0,7	0,7	0,7
V, %	2,0	1,8	2,4
20,0 мг/л			
Расстояние миграции, мм	52,3	52,9	52,7
S	1,0	0,6	0,9
V, %	1,8	1,2	1,6
35,0 мг/л			
Расстояние миграции, мм	60,0	60,1	60,2
S	0,7	1,0	0,8
V, %	1,1	1,6	1,4

[1]) Для получения стандартных образцов добавляли к буферу (0,1 М фосфат натрия; 0,2 М NaCl, pH 7,0), объединенной нормальной плазме или объединенной нормальной цельной крови 1,0 М раствор теофиллина до указанных концентраций. Уравновешивали 1 ч, отбирали аликвоты (12,5 мкл) и смешивали их с ферментным реагентом (1 мл). Представлены усредненные данные для десяти повторных анализов, выполненных согласно описанию в разделе «Материалы и методы».

Чтобы установить, влияют ли основные компоненты образцов на аналитический сигнал, мы подвергли анализу стандартные смеси теофиллина, приготовленные на буфере, на нормальной сыворотке и на свежей цельной крови (табл. 10-3). Полученные результаты показали, что высота окрашенного фронта мало зависит от состава образца. Несмотря на известную способность эритроцитов связывать лекарственные препараты (Mitenko, Ogilvie, 1973), весь теофиллин в смеси, содержащей ферментный реагент, удается количественно определить при любом составе образца. В специальных опытах было показано, что равновесие в реакции связывания с эритроцитами после добавления ферментного реагента быстро (в течение одной минуты) и полностью смещается в сторону свободного лекарственного препарата (Zuk et al., 1985).

Возможность использовать в неинструментальных методах цельную кровь дает некоторые преимущества по сравнению с традиционными методами анализа. Эти преимущества особенно заметны при тестировании на приеме у врача и в пунктах первой помощи. Благодаря тому, что не нужно получать сыворотку или плазму, упрощается выполнение анализа и сокращается его продолжительность. К тому же пациенты испытывают меньше неудобств, так как вместо венозной крови можно использовать капиллярную кровь из пальца.

Стабильность калибровочной кривой

Было бы желательно исключить необходимость частой перекалибровки и постоянно пользоваться одной и той же стандартной кривой иммунохроматографического анализа, построенной сразу после изготовления индикаторных полосок. Для этого компоненты аналитической системы, и в первую очередь иммобилизованные антитела, должны быть устойчивыми, чтобы количественные определения были достоверными в течение всего срока хранения реагентов. С целью изучения стабильности калибровочной кривой периодически анализировали ряд стандартных растворов теофиллина с помощью индикаторных полосок, которые хранили в сухом виде при 4 и 37 °С. За 21 нед мы не обнаружили закономерного изменения расстояния миграции.

Таблица 10-4. Точность и воспроизводимость анализа

А. В пределах одной серии измерений[1]			
	Теофиллин, мг/л		
	2,5	10,0	35,0
Сыворотка ($n=20$)			
Среднее значение, мг/л	2,4	10,1	33,4
S	0,1	0,5	1,7
V, %	4,9	5,1	5,2
Цельная кровь ($n=20$)			
Среднее значение, мг/л	2,5	10,5	32,9
S	0,2	0,7	2,7
V, %	7,1	6,9	8,1
Б. Для разных серий измерений[2]			
	Теофиллин в сыворотке пациентов		
	1	2	3
Среднее значение, мг/л	6,9	15,3	29,1
S	0,4	1,2	1,5
V, %	5,8	7,9	5,0

[1]) К объединенным образцам нормальной сыворотки или цельной крови добавляли теофиллин до указанных концентраций. Для каждого образца проводили двадцать повторных измерений.

[2]) Анализировали индивидуальные образцы сыворотки трех пациентов, выполняя по четыре повторных измерения в течение пяти дней подряд. Представлены средние для пяти дней величины.

Клинические характеристики

Воспроизводимость иммунохроматографического метода, как и других твердофазных конкурентных методов, сильно зависит от однородности распределения антител (или антигена) на твердой поверхности. Данные, приведенные в табл. 10-3, показывают, что обычно этот метод обеспечивает равномерное распределение. Стандартное отклонение (S) расстояния миграции, как правило, меньше 1 мм для концентраций, лежащих в диапазоне калибровки. Характеристикой степени однородности служит и коэффициент вариации (V), который в условиях анализа составляет 5—8% (табл. 10-4). Аналитическое обнаружение теофиллина, растворенного в сыворотке или цельной крови, колеблется в пределах 95—106% и существенно не изменяется при высоком содержании эндогенных веществ, таких, как гемоглобин, триглицериды или билирубин (Zuk et al., 1985). Для оценки достоверности анализа с применением индикаторных полосок сравнили данные, полученные при анализе теофиллина, с результатами EMIT^R-анализа (рис. 10-20). Между двумя методами наблюдалась отличная корреляция ($y=1{,}03x+0{,}82$; $r=0{,}98$; $S_m=1{,}3$; $n=75$, где y — результат иммунохроматографического анализа).

Обсуждение

При создании индикаторных полосок для количественных определений можно использовать принципы обычных гомогенных и гетерогенных методов анализа. Как правило, во всех этих методах применяют приборы, чтобы удовлетворить строгим требованиям к контролю температуры, точному измерению времени и

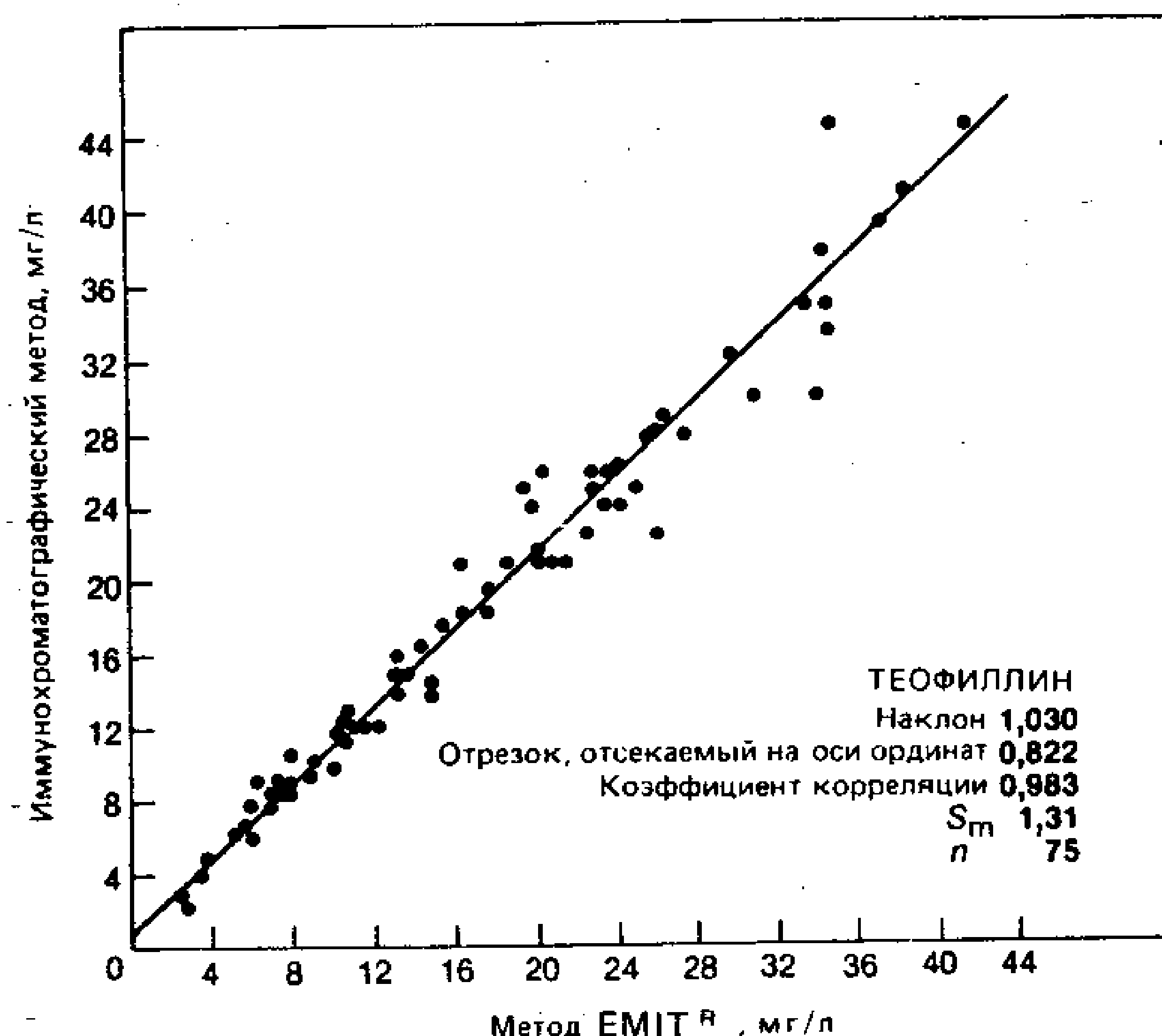


Рис. 10-20. Изучение корреляции результатов, полученных при определении теофиллина иммунохроматографическим методом и методом EMIT^R, в аликвотах сыворотки (12,5 мкл) больных астмой. Публикуется с разрешения издательства (Zuk et al., 1985).

построению калибровочной кривой. Очевидно, что с точки зрения простоты, скорости и удобства измерений анализ с помощью индикаторных полосок лучше построить на основе гомогенных методов. Гринквист с соавторами (Greenquist et al., 1981) и Тихач с соавторами (Tyhach et al., 1981) предложили изящные модификации иммуноанализа с применением субстрата в качестве метки и соответственно иммуноанализа на основе реактивации апофермента. (Для подробного ознакомления с исходными методами читатель может обратиться к гл. 6 и 7 этой книги.) В обоих модифицированных методах полоски служат инертным носителем для сухих реагентов. При нанесении на полоску определенного количества разбавленной сыворотки пациента реагенты активируются и вступают в иммунохимическую реакцию. После непродолжительной инкубации измеряют интенсивность окрашивания полоски при помощи настольного рефлектометра. На примере этих методов впервые была показана возможность быстрого количественного контроля лекарственных средств в сыворотке или плазме с использованием простейшего оборудования.

Еще более удобен для нелабораторного тестирования иммунохроматографический метод, позволяющий анализировать цельную кровь и считывать результаты визуально. Это возможно благодаря особому принципу анализа, связывающему иммуноспецифический сигнал с хроматографической подвижностью ферментной метки, а не с ее активностью.

Краткое содержание и перспективы

Методы иммуноферментного анализа с применением индикаторных полосок, рассмотренные в этой главе, относятся к группе быстро развивающихся методов анализа «на месте», требующих минимального оборудования. Фермент-зависимые иммунохимические индикаторные полоски высокочувствительны и позволяют легко и быстро определять низкомолекулярные лекарственные препараты, а также высокомолекулярные белковые антигены. Можно разработать как качественные, так и количественные методы для самых разнообразных аналитических и клинических целей. Иммунохроматографический метод, обеспечивающий точное визуальное определение концентрации лекарственных средств в цельной крови и требующий от пользователя лишь минимальных навыков, отражает современную тенденцию к упрощению анализа. Мы надеемся, что тенденция к простоте у удобству анализа сохранится и что в новых разработках усилия будут направлены на дальнейшее уменьшение числа манипуляций, продолжительности анализа и его восприимчивости к внешним условиям.

Быстрый прогресс в области технологии иммуноферментного

анализа с применением индикаторных полосок сделал возможным удобное нелабораторное тестирование в нетрадиционной обстановке, например в кабинете врача, дома или на рабочем месте. Методы с использованием индикаторных полосок улучшат качество медицинского обслуживания, так как они мгновенно дают ответы на вопросы, возникающие при лечении, помогают врачам проводить индивидуальную лекарственную терапию и контролировать состояние больных. Нетрудно представить себе применение этих методов для самоконтроля, а также в животноводстве, земледелии, криминалистике. Вероятно, анализ с помощью индикаторных полосок принесет пользу во многих областях, от планирования рождаемости до повышения безопасности труда.

Литература

Berezin I. V., Klibanov A. M., Samokhin G. P. et al., 1977. Mechanosensitive and sound-sensitive enzymatic systems as chemical amplifiers of weak signals. In: Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins, 2, T. M. S. Chang, ed., Plenum Press, New York, pp. 237—251.

Ю. Я. Борисов и *Ю. Г. Статников*, 1966. Измерение толщины пограничного слоя при наличии звукового поля. Акустич. ж., 12: 372—373.

Chen R., Weng L., Sizto N. C., Osorio B., Hsu C. J., Rodgers R., Litman D. J. (1984). Ultrasound accelerated immunoassay, as exemplified by enzyme immunoassay of choriogonadotropin, Clin. Chem., **30**, 1446—1451.

Engvall E., Perlmann P. (1971). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G, Immunochemistry, **8**, 871—874.

Glad C., Grubb A. O. (1978). Immunocapillary migration — A new method for immunochemical quantitation, Anal Biochem., **85**, 180—187.

Greenquist A. C., Walter B., Li T. (1981). Homogeneous fluorescent immunoassay with dry reagents, Clin. Chem., **27**, 1614—1617.

Lilly M. D., 1976. Enzymes Immobilized to Cellulose. In: Methods of Enzymology, Immobilized Enzymes, Klaus Mosback, ed., Academic Press, New York, Vol. XLIV, pp. 46—53.

Litman D. J., Hanlon T. M., Ullman E. F. (1980). Enzyme channeling immunoassay: A new homogeneous enzyme immunoassay technique, Anal. Biochem., **136**, 223—229.

Litman D. J., Lee R. H., Jeong H. J., Tom H. K., Stiso S. N., Sizto N. C., Ullman E. F. (1983). An internally referenced test strip immunoassay for morphine, Clin. Chem., **29**, 1598—1603.

Lowry O. H., Rosenbrough N. H., Farr A. L., Randall A. J. (1951). Protein measurements with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem., **193**, 265—275.

Maiolini R., Masseyeff R., 1975. A sandwich method of enzyme immunoassay. I. Application to rat and human alphafetoprotein, J. Immunol Methods, **8**, 223—234.

Mitenko P. A., Ogilvie R. I. (1973). Pharmacokinetics of intravenous theophylline, Clin. Pharmacol. Ther., **14**, 509—513.

Mosbach K., Mattiasson B. (1970). Matrix bound enzymes, Part 2, Studies on a matrix bound two enzyme system, Acta Chem. Scand., **24**, 2093—2100.

Schneider R. S., Linquist P., Wong E. T. (1973). Homogeneous enzyme immunoassay for opiates in urine, Clin. Chem., **19**, 821—825.

Tyhach R. J., Rupchock P. A., Pendergrass J. H., Skold A. C., Smith P. J., Johnson R. D., Albarella J. P., Profitt J. A. (1981). Adaptation of prosthetic-group label homogeneous immunoassay to reagent strip format, Clin. Chem., **27**, 1499—1504.

Ullman E. F., Gibbons I., Weng L., Dinello R., Stiso S. N., Litman D. J. 1983. Homogeneous immunoassays and immunometric assays employing enzyme chanelling. In: Diagnostic Immunology: Technology Assessment (CAP Conference, 1983), R. M. Nakamura and J. H. Rippey, eds., College of American Pathologists.

Yoshitake S., Yamada Y., Ishikawa E., Masseyeff R. (1979). Conjugation of glucose oxidase from *Aspergillus niger* and rabbit antibodies using N-hydroxysuccinimide ester of N-(4-carboxycyclohexylmethyl)maleimide, Eur J. Biochem., **101**, 395—399.

Zuk R. F., Ginsberg V. K., Houts T., Rabbie J., Merrick H., Ullman E. F., Fisher M. M., Sizto C. C., Stiso S. N., Litman D. J., 1985. Enzyme Immunochromatography — A non-instrumental, quantitative immunoassay method, v. 31, N 7, p. 1144—1150.

Глава 11

Флуоресцентный иммуноферментный анализ без разделения компонентов с использованием проточно-инжекционной системы

Т. Келли

Введение

Иммуноферментный анализ (ИФА) оказался жизнеспособной альтернативой уже заслужившим признание радиоиммунологическим методам. Поскольку он достаточно дешев, отличается высокой устойчивостью реагентов, чувствительностью и быстротой, в продаже появились специальные наборы для определения веществ с помощью ИФА (Monroe, 1984). В большинстве вариантов ИФА за ходом индикаторной ферментативной реакции следят по изменению окраски. При использовании флуоресцентной системы детектирования методы ИФА становятся еще более чувствительными и избирательными и в то же время остаются простыми, быстрыми и дешевыми (Kelly, Christian, 1982).

Работа флуоресцентной системы детектирования зависит от нескольких параметров (Soini, Hemmila, 1979). Правильно выбрав длины волн возбуждения и испускания, можно уменьшить помехи и увеличить отношение сигнала к фону. Вещества, не способные к флуоресценции, под действием фермента превращаются в флуоресцирующие продукты. Детектирование может быть основано и на тушении флуоресценции субстрата. Оптимизация температуры, pH, состава раствора, ионной силы и вязкости позволяет усилить сигнал, а также улучшить характеристики работы фермента. При создании системы детектирования могут оказаться полезными такие инструментальные приемы, как поляризация флуоресценции и разрешение по времени.

Автоматизация значительно повысила качество некоторых новых систем ИФА, имеющихся в продаже (Monroe, 1984). Возросла не только скорость определения, но и точность, причем выполнение анализа упростилось. Эти преимущества обеспечивает, в частности, проточно-инжекционный анализ. Его удобнее применять в случае гомогенных методов, однако в результате последних модификаций он стал пригодным и для гетерогенных систем.

В проточно-инжекционном анализе фиксированный объем жидкого образца быстро вводят в непрерывный ламинарный поток (в этом потоке нет дробления пузырьков воздуха). Перемешивание происходит в результате радиальной диффузии (Ruzicka, Hansen, 1981). Реагенты могут содержаться в потоке или

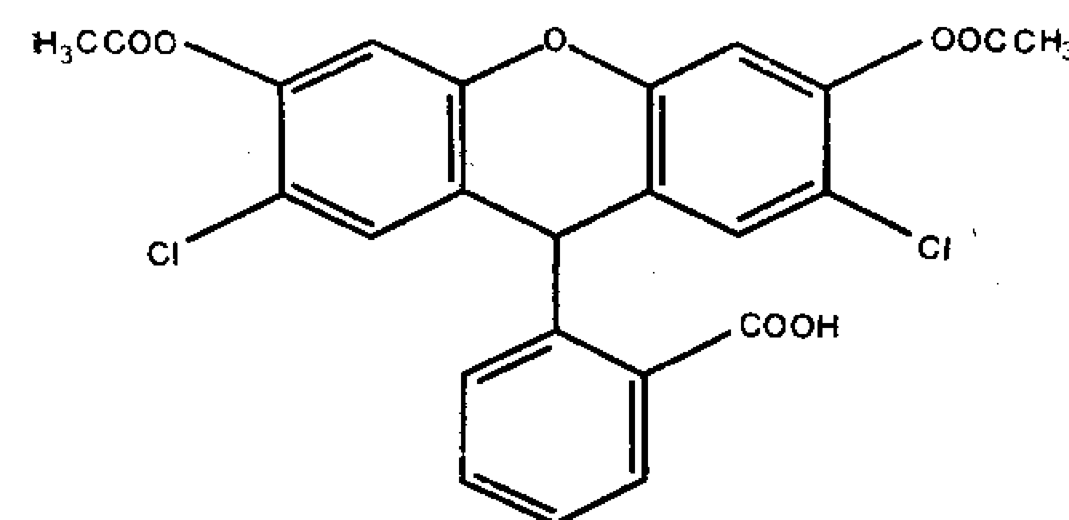


Рис. 11-1. Строение лейкодиацетилдихлорфлуоресцеина (ЛДАДХФ; 3′,6′-диацетил-2′,7′-дихлорфлуоресцеина).

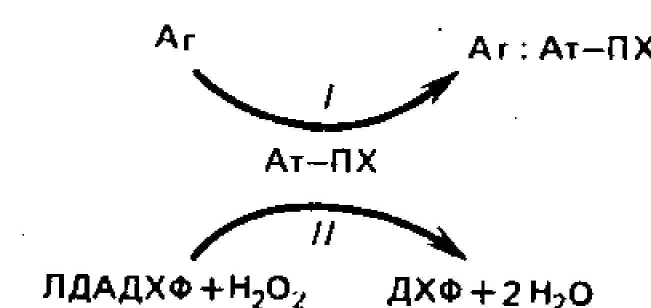


Рис. 11-2. Схема реакций, протекающих при гомогенном флуоресцентном иммуноферментном анализе с применением антител, меченных ферментом.

их иммобилизуют на омываемых потоком поверхностях. Детектирование производят каким-либо способом в определенном месте потока, получая сигналы, пропорциональные концентрации определяемого вещества. Регулируя длину, диаметр и форму трубки, а также скорость потока, можно добиться оптимального для данного теста диспергирования образца и уменьшения продолжительности анализа, а также расхода образца и реагентов. При использовании автоматических пробоотборников и управлении системой с помощью микропроцессоров анализ можно полностью автоматизировать.

В этой главе описан гомогенный метод ИФА, основанный на использовании проточно-инжекционной системы и новой флуоресцентной схемы детектирования (Kelly, Christian, 1982). Фермент — пероксидазу хрена (ПХ) конъюгируют с антителами (Ат) против IgG человека. ПХ катализирует окисление лейкодиацетилдихлорфлуоресцеина (ЛДАДХФ, рис. 11-1) пероксидом водорода с образованием сильно флуоресцирующего дихлорфлуоресцеина (ДХФ). Связывание меченых антител с антигеном — IgG — частично ингибирует активность фермента. Это заметно по уменьшению интенсивности флуоресценции продукта, образующегося в индикаторной реакции (рис. 11-2).

Основу системы для проточно-инжекционного анализа составляет двухканальный трубопровод, по которому прокачивают два реагента (рис. 11-3). Система автоматически обеспечивает требуемую последовательность реакций и детектирование с помощью лазерного флуориметра с фильтром, снабженного проточной ячейкой (Kelly, Christian, 1981).

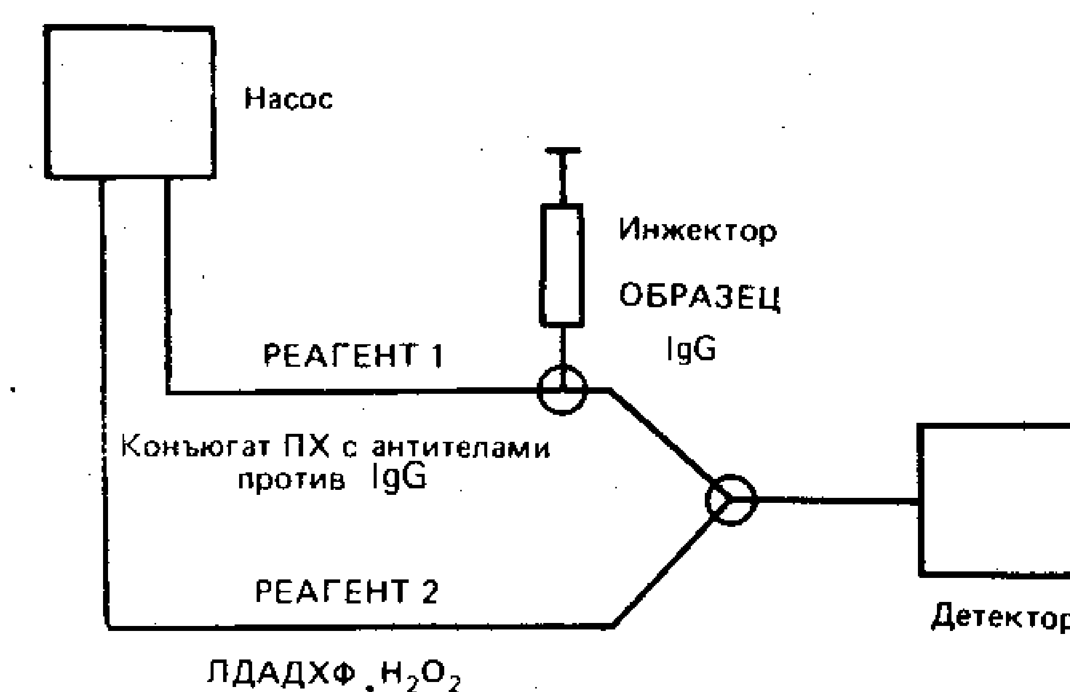


Рис. 11-3. Аналитическая проточно-инжекционная система с использованием двух реагентов.

Содержание IgG имеет большое значение для диагностики многих болезней, связанных с иммунной системой непосредственно или косвенно, например рака, болезней печени или почек (Brown et al., 1979). Немаловажную роль в выборе модельным антигеном именно IgG сыграло и то, что макромолекулы типа IgG обычно определяют гетерогенными методами. Когда было показано, что это не единственно возможный подход (Ngo, Lenhoff, 1981), разработка новых гомогенных методов ИФА получила дополнительный импульс.

Методы

Для приготовления и разбавления всех растворов используют фосфатно-солевой буфер [ФСБ: 0,02 М фосфат, 0,15 М хлорид натрия, 1% полиэтиленгликоля (PEG — 6000, Sigma), pH 7,4], прокипяченный с целью защиты белков от разрушения бактериями. Все рабочие растворы готовят в день использования.

Оптимизация анализа

При изучении равновесного связывания антигена с антителами и активности ферментного конъюгата применяли стационарный спектрофлуориметр «Perkin — Elmer 650—10S». Флуоресценцию возбуждали при 488 нм и измеряли при 525 нм. С интервалом в 30 с добавляли следующие компоненты: а) 2,8 мл раствора IgG человека (25 мкг/мл; Sigma); б) различные объемы растворов ПХ (35 МЕ/мл; Sigma) или конъюгата ПХ и антител против IgG человека (разведение 1:20; Miles — Yeda, Ltd; изменения объема пренебрежимо малы по сравнению с суммарным конечным объемом); в) 50 мкл 10^{-5} М активированного ЛДАДХФ, синтезированного по методу Брандта и Кестона (Brandt, Keston, 1965), г) 50 мкл 10^{-5} М пероксида водорода. Изменение интенсивности флуоресценции регистрировали после добавления каждого раствора. На стадии г) инициируется индикаторная реакция, приводящая к изменению окраски.

Выполнение анализа

Флуориметр настраивают согласно инструкциям, приведенным в работе Келли и Кристьяна (Kelly, Christian, 1981). Луч аргонового ионного лазера (488 нм) фокусируется на проточной ячейке и затем проходит через оптическую систему, содержащую фильтр с ограниченной полосой пропускания. Применение фильтра позволяет собрать излучение с длиной волны больше 520 нм и, таким образом, устранить помехи, создаваемые рассеянным излучением.

Проточную систему собирают, как показано на рис. 11-3. Инжектор с петлей на 25 мкл соединяют с проточной ячейкой при помощи тефлоновых трубок длиной 1,0 м и диаметром 0,8 мм. Такие же трубки можно использовать и для других соединений в системе, чтобы уменьшить чрезмерное диспергирование. Поток, содержащий краситель и пероксид водорода (реагент 2), должен сливаться с потоком, содержащим исследуемый образец, на полпути от инжектора к детектору. Для прокачивания жидкостей без пульсаций используют сжатый воздух и резервуары для реагентов. В двух регулируемых воздушных потоках устанавливают давление 0,36 и 0,32 атм (соответственно для реагента 1 и реагента 2 вместе с несущим потоком). Это обеспечивает следующие скорости: 0,50 мл/мин для реагентов 1 и 2; 1,60 мл/мин для несущего потока.

В анализе используют реагенты и образцы следующего состава: реагент 1 — конъюгат [ПХ — антитела против IgG человека] в разведении 1:250; реагент 2 — 10^{-5} М активированный ЛДАДХФ и 10^{-4} М пероксид водорода; дистиллированную деионизованную воду для несущего потока; стандартные растворы — очищенный кристаллический IgG человека в различных концентрациях; образцы сыворотки в разведении 1:700 (для одного определения требуется 0,1 мкл сыворотки), предварительно подвергнутые анализу методом радиальной иммунодиффузии («Tri — Partigen», Calbiochem).

После включения системе дают прогреться в течение 15 мин для выхода в стабильный режим. Инъекции можно производить каждые 60 с.

Результаты

Оптимизация анализа

Сначала мы изучили характеристики индикаторной реакции. В качестве красителя был выбран ЛДАДХФ, так как он окисляется широко распространенным ферментом ПХ с образованием флуоресцирующего продукта ДХФ. ЛДАДХФ не обладает флуоресцирующими свойствами, а ДХФ сильно флуоресцирует, причем возбуждение и испускание происходят при длинах волн, исключающих помехи, которые могут быть созданы рассеянным излучением или основными компонентами образцов. Для оптимизации характеристик раствора использовали вышеописанный метод (Kelly, Christian, 1981), который несколько модифицировали в соответствии с требованиями иммунохимической реакции. Для эффективного уменьшения фонового сигнала, обусловленного аутоокислением (Kelly, Christian, 1982), и ускорения связывания антигена с антителами (Buffone et al., 1975) добавляли полиэтиленгликоль.

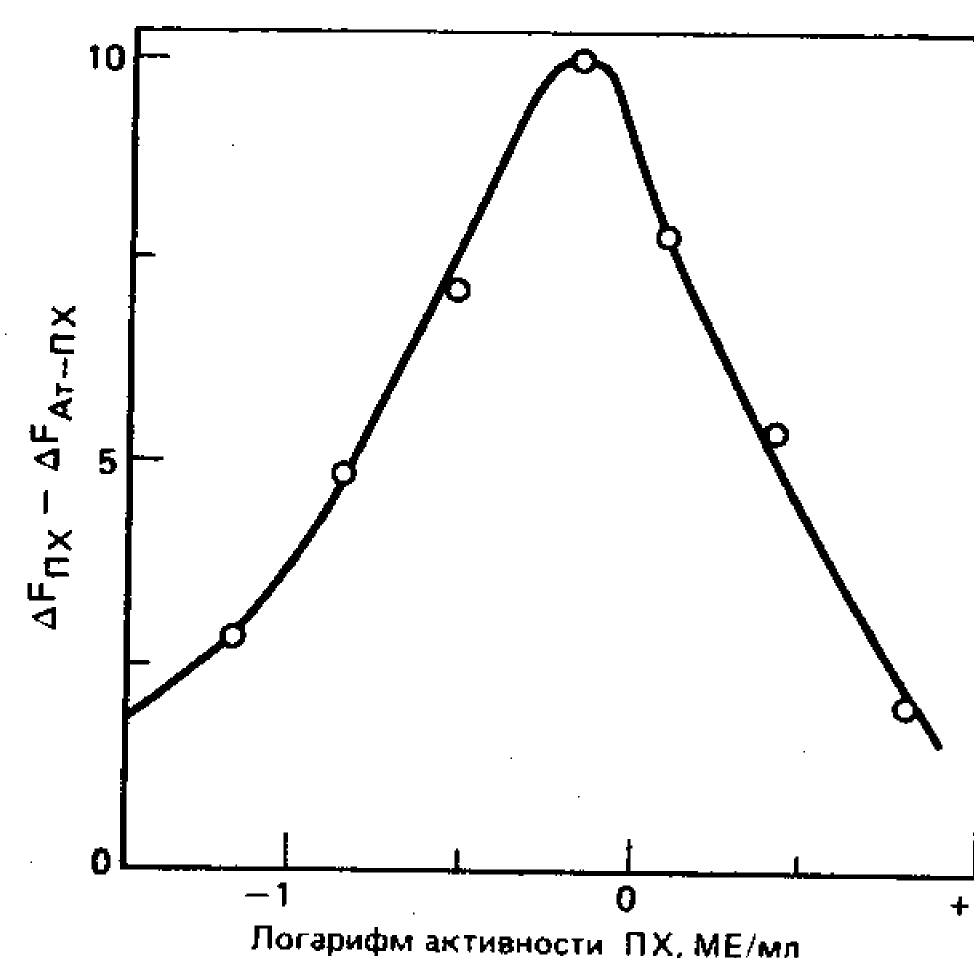


Рис. 11-4. Разность изменений интенсивности флуоресценции, возникающей под действием свободной пероксидазы и пероксидазы в составе конъюгата с антителами. Состав реакционной смеси: IgG (25 мкг/мл), активированный ЛДАДХФ (10^{-5} М) и пероксид водорода 10^{-5} М) в фосфатно-солевом буфере.

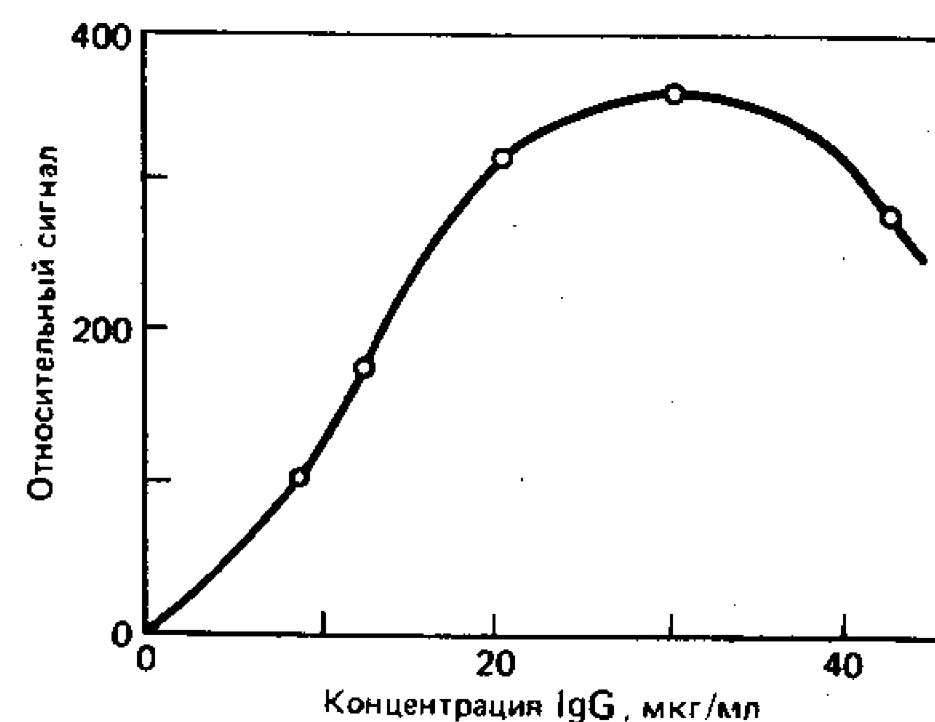


Рис. 11-5. Зависимость сигнала флуоресценции от концентрации IgG в образцах сыворотки (кривая связывания). В поток, содержащий конъюгат [ПХ — антитела против IgG человека] в фосфатно-солевом буфере (разведение конъюгата 1 : 250), вводили 25 мкл образца, разбавленного в 700 раз. Через 30 с образец сливался с потоком, содержащим активированный ЛДАДХФ (10^{-5} М) и пероксид водорода (10^{-4} М) в фосфатно-солевом буфере. Флуоресценцию измеряли в проточной ячейке еще через 30 с.

Характеристики оборудования были описаны ранее (Kelly, Christian, 1981). Стабильность проточной системы составляет ±2%. При измерениях проточным флуориметром сигнал пропорционален концентрации красителя в диапазоне четырех порядков. Нижний предел обнаружения равен 10^{-11} М.

Изучение аналитического сигнала позволило выявить некоторые его особенности, важные для работы обсуждаемой здесь системы. В отсутствие IgG конъюгированный фермент проявляет такую же активность, как и свободный. Если раствор содержит IgG, антиген присоединяется к антителам и ингибирует активность фермента в составе конъюгата. Степень ингибирования зависит от соотношения концентраций антигена и антител. Хотя за 30 с происходит полное связывание, никакой преципитации мы не наблюдали. Благодаря этому удалось создать удобную методику иммуноанализа с применением проточно-инжекционной системы.

Ингибирование ферментного конъюгата позволяет построить кривую, отражающую стехиометрию связывания. На рис. 11-4 отложены разности сигналов, полученных в присутствии комплексов [ПХ—антитела — антиген] и в присутствии свободной ПХ. Максимальный сигнал при концентрации ПХ 0,56 МЕ/мл соответствует разбавлению конъюгата антител в 1250 раз и концентрации IgG 25 мкг/мл, т. е. 700-кратному разбавлению сыворотки с высоким содержанием IgG. На эти концентрации мы ориентировались при использовании проточной системы.

Характеристики иммуноанализа

Поскольку условия, выбранные для проточной системы, обеспечивают максимальное ингибирование активности ПХ при высоком уровне IgG, весь диапазон нормальных концентраций IgG (8—14 мг/мл, или 11—20 мкг/мл после разбавления) попадает в область кривой связывания, соответствующую избытку антител. Это позволяет уверенно выполнять количественные определения. Патологически завышенные концентрации IgG попадают на участок кривой, соответствующий избытку антигена. В результате получают сигналы, отвечающие гораздо более низкому содержанию антигена по сравнению с его фактическим содержанием. Следовательно, результаты анализа могут быть истолкованы неправильно. Чтобы избежать возможной ошибки, следует еще сильнее разбавить образцы и повторить анализ. При использовании рассматриваемой проточной системы максимальный сигнал был получен при концентрации IgG 31 мкг/мл (рис. 11-5). Калибровку производят в интервале 2—30 мкг/мл. Наименьшая концентрация IgG, поддающаяся определению, составляет 2 мкг/мл ($1{,}2 \cdot 10^{-8}$ М, или 50 нг в 25 мкл раствора, вводимого в систему).

Чтобы установить, какова точность иммуноанализа, мы оценили аналитическое обнаружение и провели сравнительные исследования. Анализу были подвергнуты двенадцать образцов сыворотки, предварительно исследованных методом радиальной иммунодиффузии, причем определения были повторены трижды. Средний сигнал составил 96,7% от соответствующего стандартного сигнала. Аналитическое обнаружение равно в среднем 103%.

Проточная система обеспечивает точность ±9,8% в пределах одной серии измерений при максимальной скорости 60 определений в час.

В случае образцов обычного состава мы не выявили существенных помех для индикаторной реакции (Kelly, 1981). Теоретически недостаточная очистка антител может привести к ошибочным результатам, но в действительности мы этого не наблюдали.

Обсуждение

Некоторые аспекты иммуноанализа требуют дополнительных комментариев. На чувствительность анализа неблагоприятно влияет противодавление, обусловленное введением образцов. По-видимому, оно связано с тем, что реагент 1 обладает повышенной вязкостью из-за присутствия полиэтиленгликоля. При использовании обводного потока для инъекции или модифицированной системы прокачивания точность измерений может значительно возрасти. Вероятно, чувствительность метода может увеличиться при работе с более сложной оптической системой. Характеристики анализа улучшатся благодаря применению моноклональных антител, а стабильность окрашивания возрастет при обеспечении лучших условий для ферментативной индикаторной реакции. Однако даже и без этих усовершенствований рассмотренная здесь система иллюстрирует эффективность нового подхода к разработке гомогенных методов ИФА.

К настоящему времени создано сравнительно немного вариантов гомогенного флуоресцентного ИФА. Метод, получивший наибольшее распространение, предложили Берд и соавторы (Burd et al., 1977). Это экспрессный конкурентный метод, в котором в качестве метки используют субстрат. Умбеллиферил-β-галактозид, не способный флуоресцировать, соединяют с лекарственным препаратом. Этот конъюгат служит субстратом для β-галактозидазы и в результате реакции превращается в флуоресцирующий продукт. Связывание конъюгата с антителами против лекарственного препарата инактивирует субстрат. Свободный лекарственный препарат, содержащийся в образце, конкурирует за связывание с антителами, и в результате конъюгат получает возможность взаимодействовать с ферментом. Метод был использован для определения ряда лекарственных препаратов (Burd et al., 1977, 1978; Wong et al., 1979), а также белков (Ngo et al., 1979, 1981). Он обеспечивает хорошую точность и воспроизводимость; предел обнаружения составляет ~1 мкг/мл при использовании 1—2 мкл образца. Однако на анализ уходит от нескольких до двадцати минут, так как он предполагает выполнение ряда манипуляций и измерений. Японские специалисты несколько упростили этот метод благодаря использованию многослойного индикаторного фильтра с иммобилизованными реагентами («Terumo Corporation», 1983).

Была предпринята попытка использования в той же схеме анализа другой комбинации реагентов (Burd et al., 1977). Флуорофором служил умбеллиферон (или флуоресцеин). Ковалентно присоединив его к биотину (или 2,4-динитрофенильному производному биотина) через сложноэфирную связь, получили нефлуоресцирующий конъюгат. Сложноэфирную связь расщепляли при помощи свиной эстеразы. Связывание с авидином (или с антителами к ДНФ-группам) инактивирует субстрат. Правда, из-за ряда осложнений этот метод оказался не очень эффективным.

Другая ферментная система была использована в принципиально ином методе ИФА (Litman et al., 1980). Литман и соавторы реализовали в гомогенном иммуноанализе идею «ферментных каналов». Ее суть состоит в том, что два фермента, катализирующих последовательные превращения субстрата, в результате иммунохимической реакции оказываются в тесном контакте. Это приводит к повышению скорости и специфичности ферментативной реакции. Антиген (IgG) ковалентно связывают с одним из ферментов — гексокиназой. Второй фермент — глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназу — иммобилизуют совместно с антителами против IgG человека на гранулах сефадекса. Определяемое вещество (IgG) конкурирует с конъюгатом первого фермента за связывание с гранулами. В отсутствие IgG образуется больше комплексов, содержащих оба фермента, и, таким образом, скорость превращения глюкозы, ATP и NAD в глюконолактон-6-фосфат, ADP и NADH максимальна. NADH измеряют по флуоресценции при 450 нм. Важным преимуществом метода является снижение предела обнаружения до 1 нг/мл. Однако метод не лишен таких недостатков, как большая продолжительность определения, низкая точность и чувствительность к помехам.

Требования к аналитическим системам, поступающим в продажу, постоянно возрастают. Безусловно, флуоресцентные методы ИФА могут им удовлетворить. Новые методы должны быть скоростными, универсальными и простыми при низкой стоимости. Достижению этих целей может способствовать автоматизация. Предстоит еще изучить применение различных ферментов и флуорофоров, средств автоматизации и схем анализа. Метод, описанный в этой главе, представляет собой шаг в этом направлении. Разработанный нами бесконкурентный метод связан с использованием меченых антител и новой пары краситель — фермент. Время анализа составляет 60 с, стоимость реагентов для одного определения — меньше восьми центов. Анализ основан на одноточечном измерении и выполняется автоматически с помощью проточно-инжекционной системы.

Краткое содержание

Описан новый гомогенный флуоресцентный метод иммуноанализа, построенный по бесконкурентному принципу с использованием одноточечной системы детектирования и автоматической проточно-инжекционной системы. Пероксидаза хрена, конъюгированная с антителами против IgG человека, катализирует окисление ЛДАДХФ (лейкодиацетилдихлорфлуоресцеи-

на) пероксидом водорода с образованием сильно флуоресцирующего продукта — ДХФ (дихлорфлуоресцеина). Связывание антител с антигеном (IgG), содержащимся в образце, частично инактивирует ПХ и, таким образом, уменьшает сигнал флуоресценции. Для определения, занимающего 60 с, требуется меньше 1 мкл сыворотки. Аналитическое обнаружение в диапазоне 2—30 мкг/мл равно в среднем 103%. Точность составляет ±9,8%.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность д-ру Г. Кристьяну за неоценимый вклад в эту работу. Его консультации, советы и поддержка способствовали успешному выполнению описанных здесь исследований.

Литература

Brandt R., Keston A. S. (1965). Synthesis of Diacetyldichlorofluorescin: A Stable Reagent for Fluorimetric Analysis, Anal. Biochem., **11**, 6—9.

Brown S. S., Mitchell F. L., Young D. S., Eds., 1979. Chemical Diagnosis of Disease, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Buffone G. P., Savory J., Hermans J. (1975). Evaluation of Kinetic Light Scattering as an Approach to the Measurement of Specific Proteins with the Centrifugal Analyzer. II. Theoretical Considerations, Clin. Chem., **21**, 1735—1746.

Burd J. F., Carrico R. J., Fetter M. C., Buckler R. T., Johnson R. D., Boguslaski R. C., Christner J. E. (1977). Specific Protein-Binding Reactions Monitored by Enzymatic Hydrolysis of Ligand-Fluorescent Dye Conjugates, Anal. Biochem., **77**, 56—67.

Burd J. F., Carrico R. J., Kramer H. M., Denning C. E., 1978. Homogeneous Substrate-Labeled Fluorescence Immunoassay for Determining Tobramycin Concentrations in Human Serum. In: Enzyme Labeled Immunoassay of Hormone and Drugs, Walter de Gruyter and Co., Berlin, 387—403.

Burd J. F., Wong R. C., Feeney J. E., Carrico R. J., Boguslaski R. C. (1977). Homogeneous Reactant-Labeled Fluorescence Immunoassay for Therapeutic Drugs Exemplified by Gentamicin Determination in Human Serum, Clin. Chem., **23**, 1402—1408.

Kelly T. A., 1981. Fluorimetric, Electrochemical, and Flow Injection Analysis of Enzyme and Immunochemical Systems, Doctoral Dissertation.

Kelly T. A., Christian G. D. (1981). Fluorimeter for Flow Injection Analysis with Application to Oxidase Enzyme-Dependent Reactions, Anal. Chem., **53**, 2110—2114.

Kelly T. A., Christian G. D. (1982). Capillary Flow Injection Analysis for Enzyme Assay with Fluorimetric Detection, Anal. Chem., **54**, 1444—1445.

Kelly T. A., Christian G. D. (1982). Homogeneous Enzymatic Fluorescence Immunoassay of Serum IgG by Continuous Flow Injection Analysis, Talanta, **29**, 1109—1112.

Litman D. J., Hanlon T. M., Ullman E. F. (1980). Enzyme Channeling Immunoassay: A New Homogeneous Enzyme Immunoassay Technique, Anal. Biochem., **106**, 223—229.

Monroe D. (1984). Enzyme Immunoassay, Anal. Chem., **56**, 921A—931A.

Ngo T. T., Carrico R. J., Boguslaski R. C., 1979. Homogeneous Fluorescence Immunoassay for Protein Using β-Galactosyl-Umbelliferone Label, paper presented at 2nd International Conference on Diagnostic Immunology, New England College, Henniker, New Hampshire.

Ngo T. T., Carrico R. J., Boguslaski R. C., Burd J. F. (1981). Homogeneous Substrate-Labeled Fluorescence Immunoassay for IgG in Human Serum, J. Immunol. Methods, **42**, 93—103.

Ngo T. T., Lenhoff H. M. (1981). Recent Advances in Homogeneous and Separation-Free Enzyme Immunoassays, Applied Biochem. and Biotechnol., **6**, 53—64.

Ruzicka J., Hansen E. H., 1981. Flow Injection Analysis, Wiley-Interscience, New York.

Soini E., Hemmila I. (1979). Fluoroimmunoassay: Present Status and Key Problems, Clin. Chem., **25**, 353—361.

Terumo Corp. Jpn. Kokai Tokyo Koho. (Septebber 7, 1983), Japan Patent No. 58, 150, 861, Immunoassay for the Determination of Drugs.

Wong R. C., Burd J. F., Carrico R. J., Buckler R. T., Thoma J., Boguslaski R. C. (1979). Substrate-Labeled Fluorescence Immunoassay for Phenytoin in Human Serum, Clin. Chem., **25**, 686—691.

Часть II. ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ С РАЗДЕЛЕНИЕМ КОМПОНЕНТОВ (гетерогенный анализ)

Глава 12

Иммуноферментный анализ гаптенов и антигенов с разделением компонентов (гетерогенный анализ)

Д. К. Стэндифер

Введение

Методы иммунологического анализа, применение которых сопряжено с необходимостью разделения связавшихся и несвязавшихся антигенов, были разработаны для целого ряда разнообразных гаптенов и антител (Avrameas, 1969; Voller et al., 1976; Engvall,Carlsson, 1976; O'Sullivan et al., 1979a). Среди этих методов можно выделить два типа — это методы так называемого *последовательного* (или *неконкурентного*) и *конкурентного* анализа. Наиболее широкое применение на практике находит вариант последовательного гетерогенного анализа, называемый *«фермент-зависимым иммуносорбентным анализом»* (ELISA, от англ. Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

Этот метод связан с осуществлением двухстадийного процесса, проиллюстрированного на рис. 12-1. На первой стадии антитела, адсорбированные на нерастворимом носителе или ковалентно связанные с ним, взаимодействуют с антигеном или каким-либо другим анализируемым белком. Несвязавшиеся компоненты отмывают и затем добавляют раствор, содержащий антитела, конъюгированные с ферментом. Это могут быть как сами антитела, полученные к данному антигену, так и в более общем случае любые антитела, специфичные к анализируемым белкам. Вторая стадия процесса также завершается отмывкой несвязавшихся компонентов реакционной смеси, после чего в систему вводят соответствующий субстрат для осуществления индикаторной ферментативной реакции.

При конкурентном гетерогенном анализе присутствующие в реакционной среде одновременно связанные и несвязанные с ферментативной меткой гаптены (или антигены) вступают в конкурентное взаимодействие с иммобилизованными на твердом носителе антителами. После кратковременной инкубации избыток несвязавшихся компонентов отмывают и в систему добавляют соответствующий субстрат. Схема этого анализа показана

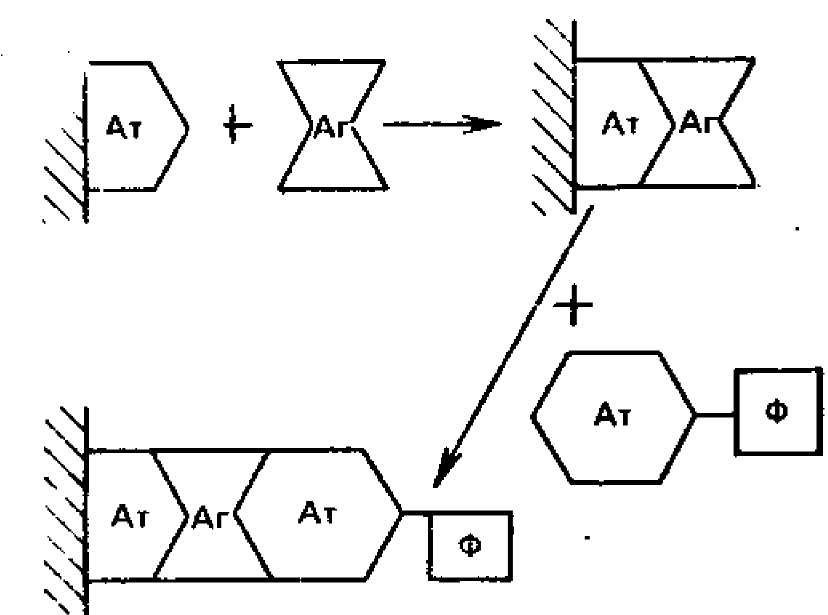


Рис. 12-1. Неконкурентный вариант ELISA. Антиген (Аг) добавляют к иммобилизованным на колонке антителам (Ат), промывают и добавляют антитела, конъюгированные с ферментом (Ф). После второй промывки добавляют субстрат и следят за образованием продукта ферментативной реакции.

на рис. 12-2. Конкурентный анализ проводится по более простой схеме, но является, как правило, менее чувствительным, чем метод ELISA. Кроме того, при конкурентном анализе в большей степени могут проявляться так называемые «матричные эффекты». В последнее время метод ELISA применяли для определения содержания в кровотоке антител против бактериальных антигенов (Elder et al., 1983; Hill et. al., 1983; Sarafian et al., 1982), вирусных антигенов (Sada et al., 1983; Isozaki et al., 1982; Franco et al., 1983), а также антител, образующихся при аутоиммунных заболеваниях (Shimomiya et al., 1982; Ishaq, Ali, 1983; Roman et al., 1984). С помощью этого метода удается также успешно определять и многие другие компоненты, такие, как ферритин (Anaokar et al., 1979), галактозилтрансфераза (Verdon et al., 1982), антиген C5a (Kunkel et al., 1983), ретинол-связывающий белок (Lucertini et al., 1984), антитела против дцДНК (Myers et. al., 1984), пролактин (Sun et al., 1983), лютропин (Rathnam, Saxena, 1984) и дигоксин (Freytag et al., 1984). Конкурентные методы удается с определенной эффективностью использовать для обнаружения хориогонадотропина человека (Yorde et al., 1976), гентамицина (Standefer, Saunders, 1978) и дигоксина (Fu et al., 1983). Для оптимизации любого из вышеупомянутых методов необходимо учитывать ряд одинаково важных для каждого из них факторов, таких, как природа и способ подготовки носителя, тип и содержание конъюгированного

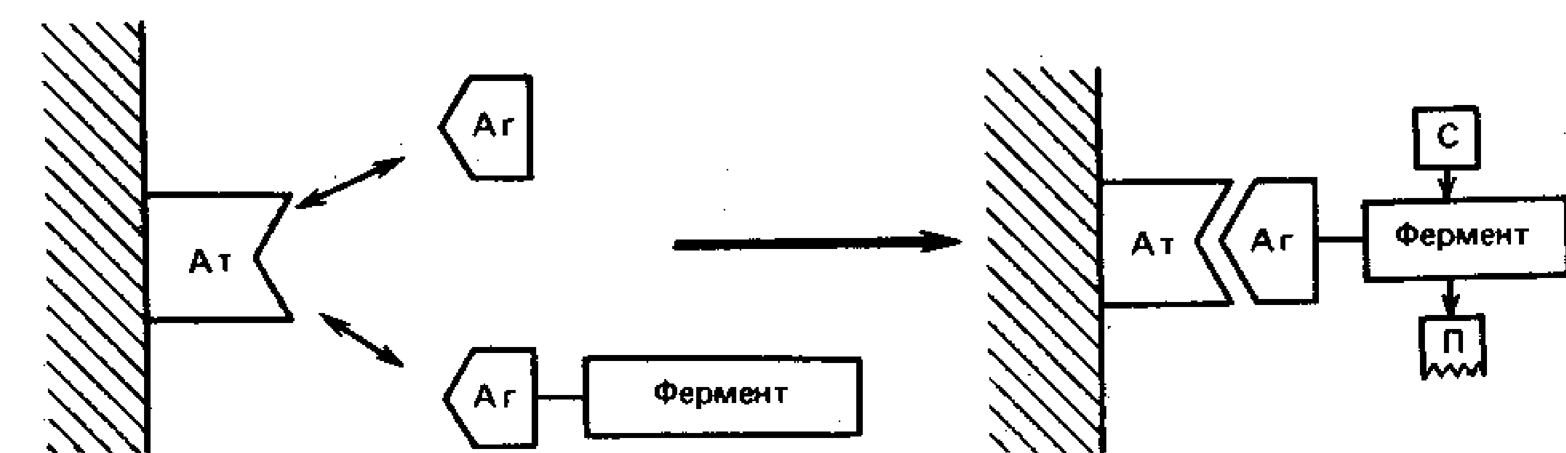


Рис. 12-2. Конкурентный вариант ELISA. К иммобилизованным на носителе антителам (Ат) добавляют смесь тестируемого гаптена (Г) и конъюгата [гаптен — фермент; (Г—Ф)]. После промывки добавляют субстрат (С) и следят за образованием соответствующего продукта (П).

фермента, последовательность реакций, время инкубации на каждом этапе.

В настоящей главе обсуждаются факторы, которые необходимо контролировать, чтобы обеспечить достаточную чувствительность и надежность метода ELISA, ряд методик иммобилизации антител на различных твердых носителях и подходы к конъюгации ферментов с антителами или гаптенами. Будет также рассмотрено значение некоторых варьируемых параметров процесса, в том числе концентрации конъюгата и времени инкубации.

Методы

Конъюгация с индикаторным ферментом

Для ковалентной пришивки индикаторного фермента к антителам было предложено несколько различных методов. В одном из первых предложенных методов использовали взаимодействие аминогрупп конъюгируемых антител и фермента с глутаровым альдегидом (Avrameas, 1969; Engvall, Perlmann, 1971). Данный метод относительно прост в использовании, однако возникающие при его применении избыточные внутримолекулярные сшивки могут снижать как ферментативную, так и иммунную активность образующихся конъюгатов. Впоследствии были разработаны и другие методы, которые позволили повысить эффективность образования ковалентных связей между антителами и ферментом без заметного снижения ферментативной и иммунной активности конъюгата. Так, для сшивки по сульфгидрильным группам белков использовали целый ряд различных производных малеимида. Производные малеимида можно разбить на два больших класса: гомобифункциональные реагенты (с активными группами одного типа) и гетеробифункциональные реагенты (с активными группами двух или более типов). В таком гомобифункциональном реагенте, как N,N′-*о*-фенилендималеимид, содержатся два одинаковых реакционных центра, каждый из которых может взаимодействовать с сульфгидрильной группой цистеина в белке (Kato et al., 1975). В гетеробифункциональном реагенте присутствуют два центра, реагирующие с различными функциональными группами аминокислотных остатков. Так, *м*-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид успешно применялся для образования сшивки между сульфгидрильными группами IgG и свободными аминогруппами галактозидазы (O'Sullivan et al., 1978). Эта реакция представлена на рис. 12-3. N-Гидроксисукцинимидное производное замещенной бензойной кислоты в мягких условиях (0,1 М фосф. буфер, pH 7,0, 30 °C, 1 ч) быстро реагирует с доступными аминогруппами иммуноглобулина. После удаления избытка реагента хроматографией на

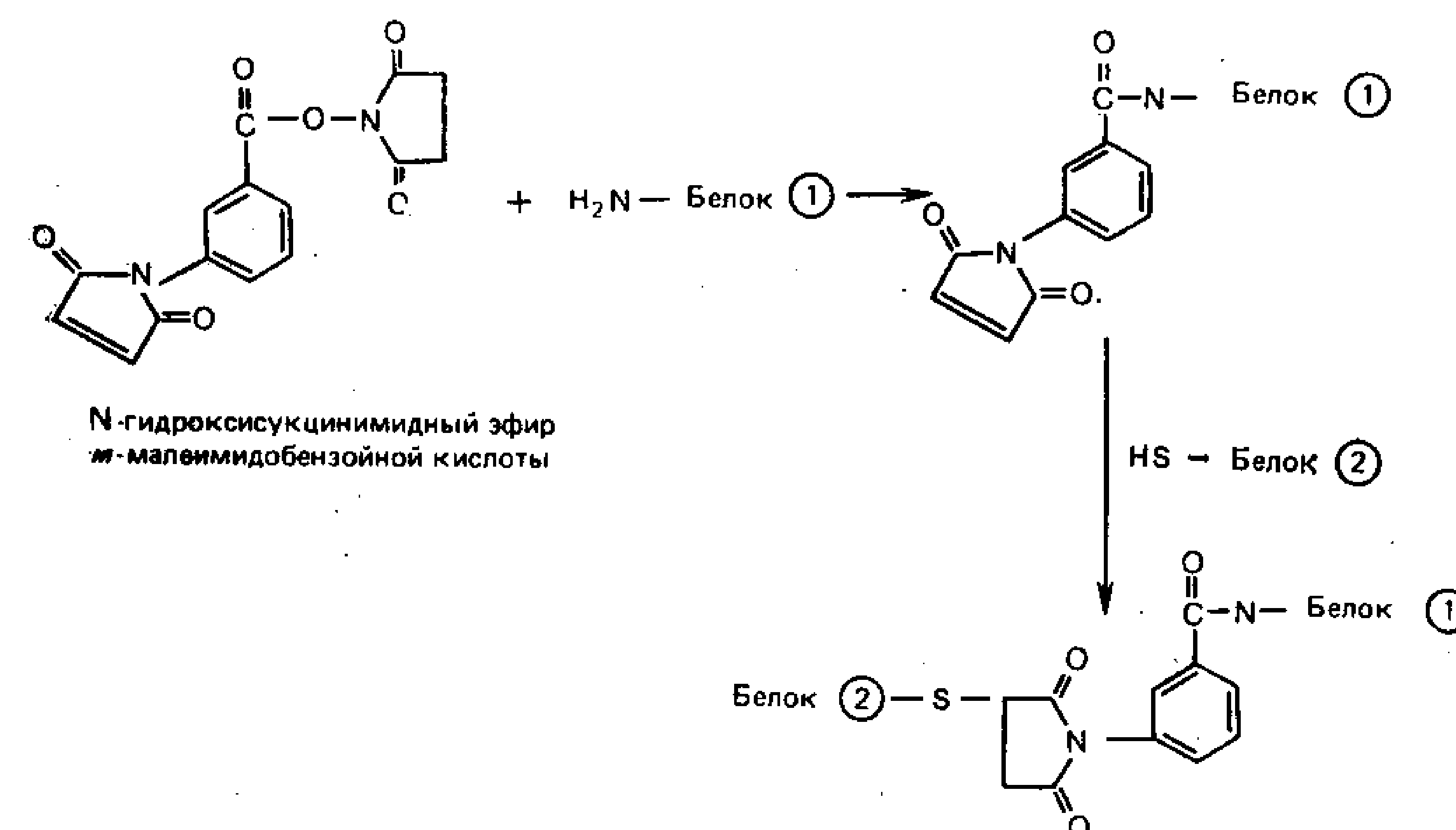


Рис. 12-3. Конъюгация антител с ферментом. Для образования сшивки между аминогруппами IgG (белок 1) и сульфгидрильными группами фермента (белок 2) используют N-гидроксисукцинимидный эфир *м*-малеимидобензойной кислоты.

сефадексе G-25 к «активированному» иммуноглобулину добавляют галактозидазу, предварительно обработанную 0,01 М меркаптоэтанолом для восстановления SH-групп. При взаимодействии остатков малеимида в иммуноглобулине с восстановленными сульфгидрильными группами галактозидазы между этими белками образуются ковалентные сшивки.

Другой подход к конъюгации — метод периодатного окисления (Nakane, Kawaoi, 1974), проиллюстрированный на рис. 12.4, пригоден для ферментов, содержащих углеводные остатки. Его использовали для связывания пероксидазы (в которой весовое содержание углеводов достигает 10—15%) как с антителами (Anaokar et al., 1979), так и с гаптенами (Standefer, Saunders, 1978). Ниже приводится несколько модифицированный вариант методики получения конъюгата с антиферритиновыми IgG.

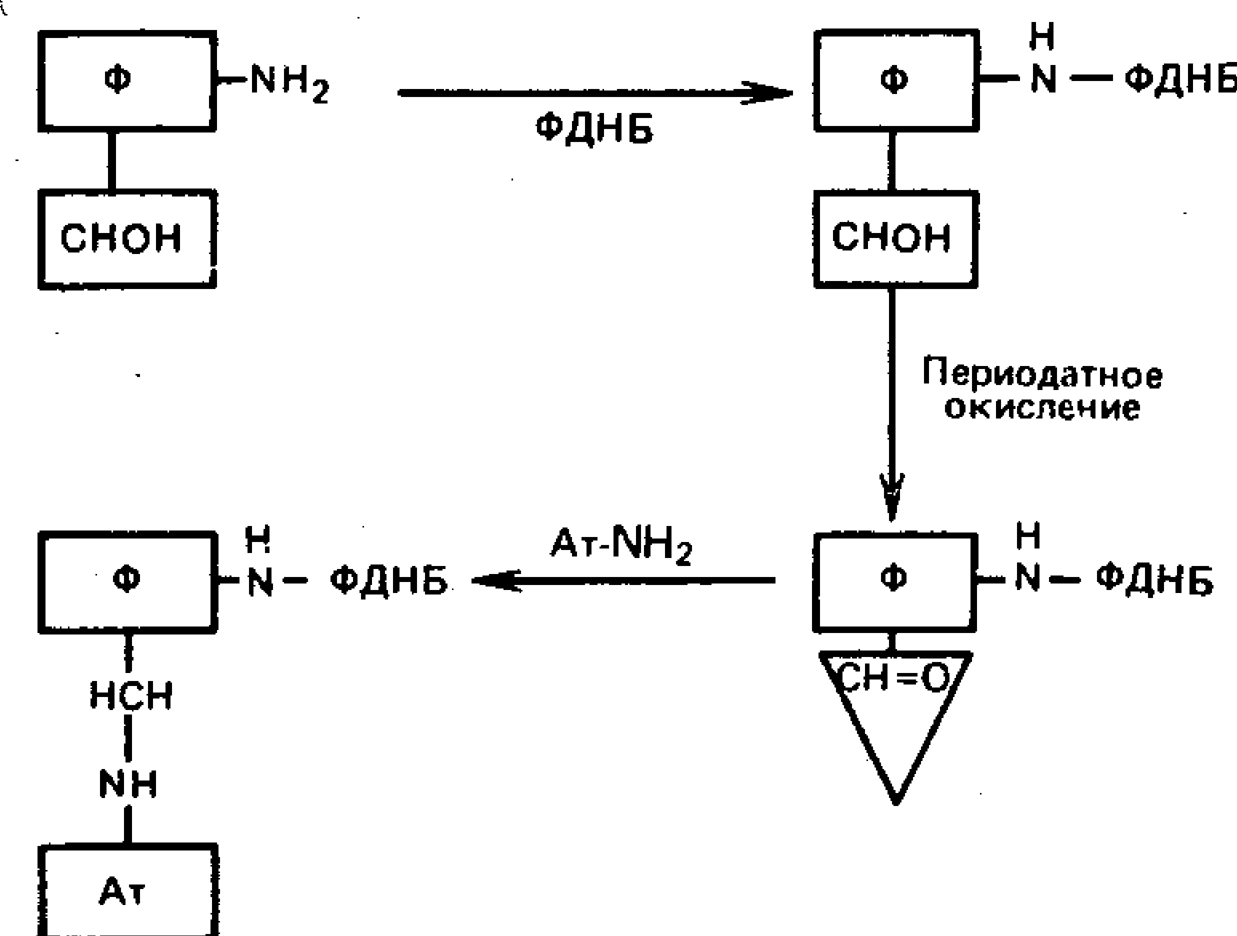


Рис. 12-4. Конъюгация антител с ферментом. Окисленные углеводные остатки (—CH-O) фермента взаимодействуют с аминогруппами IgG.

Конъюгацию пероксидазы хрена (300 МЕ/мг) с кроличьими антиферритиновыми иммуноглобулинами осуществляют в два этапа. На первом эта-

пе получают активированное производное пероксидазы, содержащее альдегидные группы («альдегид-пероксидазу»): 5 мг пероксидазы растворяют в 1,0 мл 0,3 М бикарбоната натрия, добавляют 0,1 мл раствора динитрофторбензола в этаноле (10 г/л) и осторожно перемешивают при комнатной температуре. Добавляют 1,0 мл 80 мМ водного раствора периодата натрия, осторожно перемешивают 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляют 1,0 мл 0,16 М этиленгликоля, осторожно перемешивают еще 1 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь диализуют при 4 °С в течение одного дня против нескольких смен 10 мМ карбонатного буфера, pH 9,5. Образующаяся «альдегид-пероксидаза» при 4 °С сохраняет стабильность по меньшей мере в течение месяца. На втором этапе получения конъюгата к 5 мг «альдегид-пероксидазы» добавляют 5 мг IgG и перемешивают смесь 3 ч. Образовавшийся конъюгат при пропускании через колонку с сефарозой 6В выходит со свободным объемом в виде темно-коричневой зоны. В присутствии БСА (20 г/л) при —20 °С конъюгат сохраняет стабильность в течение нескольких месяцев. Степень протекания побочного процесса самоконъюгации окисленной пероксидазы удается снизить с 35 до 5%, изменив pH среды на стадии, предшествующей окислению, от 4,4 до 9,5 (Wilson, Nakane, 1978).

Высокая стабильность ферментного конъюгата является одним из наиболее важных преимуществ методов ИФА по сравнению с радиоиммунологическим анализом. Малеимидные производные при хранении в присутствии 1% БСА, 0,1% азида натрия и меркаптоэтанола сохраняют стабильность в течение 1—2 лет (O'Sullivan et al., 1979b). Хранение конъюгата пероксидазы в течение нескольких месяцев не сопровождается сколько-нибудь заметным падением активности (Nakane, Kawaoi, 1974).

Очистка антител

Сыворотка, полученная от животных, которым вводили конъюгированный гаптен, может помимо широкого набора антител содержать балластные белки, способные мешать связыванию антител с твердым носителем. Во избежание этого исходную антисыворотку очищают с помощью двух-, трехкратного осаждения 30%-ным сульфатом аммония и диализа (Anaokar et al., 1979) или ионообменной хроматографии (Rathnam, Saxena, 1984). Для создания покрытия на поверхности носителя можно использовать и неочищенную сыворотку, однако, поскольку белки на носителе адсорбируются неизбирательно, использование очищенных антител позволяет заметно повысить чувствительность анализа. В этом можно убедиться, сравнив данные, полученные с неочищенной кроличьей сывороткой, содержащей антитела к ферритину, и данные, полученные с сывороткой, очищенной трехкратным осаждением 30%-ным сульфатом аммония. Как видно на рис. 12-5, применение очищенной антисыворотки позволяет повысить чувствительность определения примерно в 3 раза.

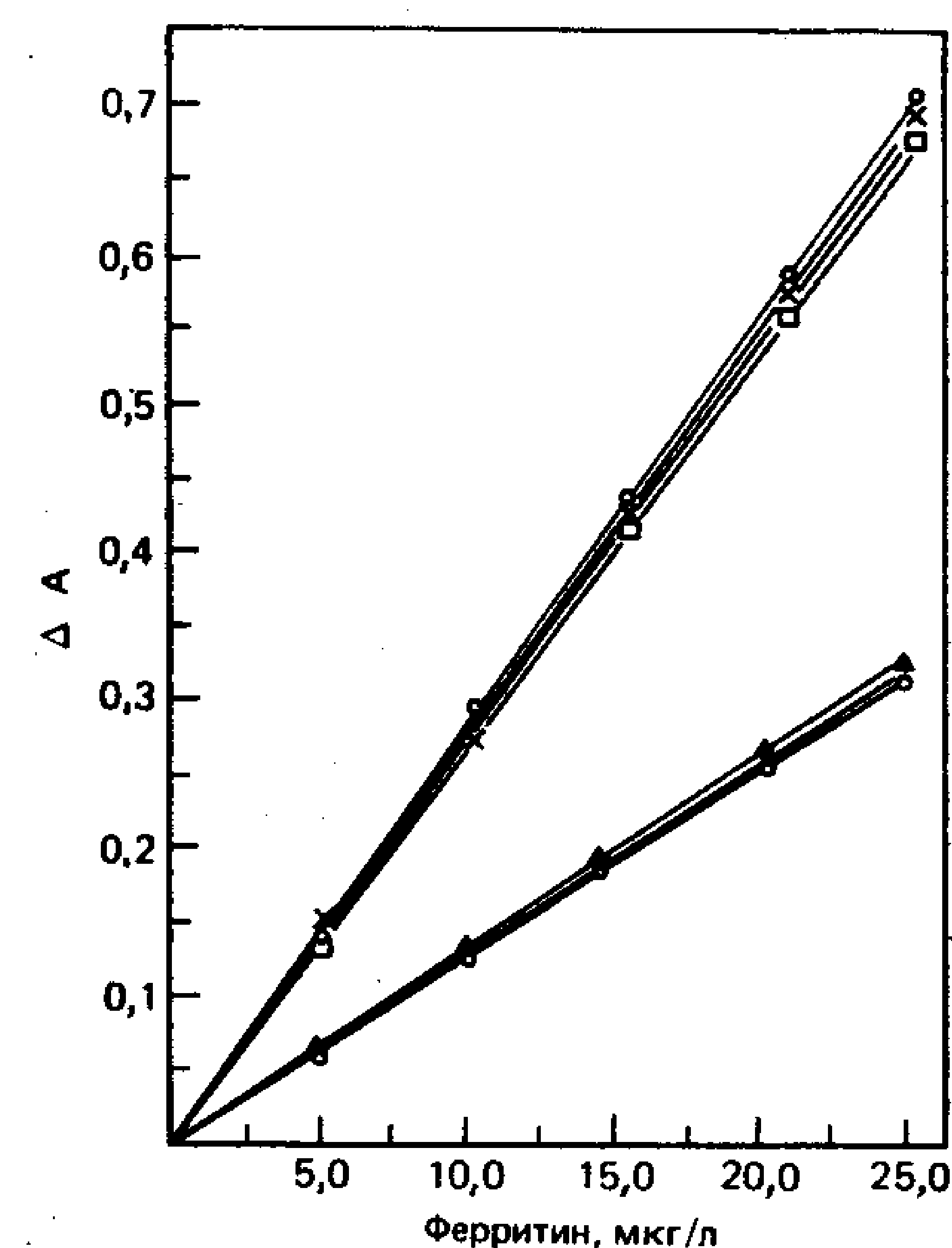


Рис. 12-5. Кривые титрования, полученные при использовании носителя, поверхность которого была обработана очищенными антителами (семейство верхних кривых) или суммарной антисывороткой (семейство нижних кривых). Подробности см. в тексте. Публикуется с разрешения Clinical Chemistry.

При обработке носителя избытком антител даже существенное разбавление используемого раствора (в несколько раз) может практически не отразиться на наклоне калибровочной кривой. Оба семейства кривых, показанные на рис. 12-5 и отражающие определение ферритина в режиме ELISA, были получены в условиях обработки носителя различными разведениями антисыворотки (от 10 000 до 100 000-кратного). Изменения в значениях поглощения (рис. 12-5) свидетельствуют о том, что 10-кратное снижение концентрации антисыворотки приводит к ослаблению связывания конъюгата лишь на 5%. Оптимальное разведение антисыворотки, т. е. максимальное разведение, позволяющее сохранить необходимую чувствительность и линейность ответа в данном диапазоне концентраций, следует подбирать эмпирически. С этой целью для данного конкретного варианта ELISA готовят серию последовательных 10-кратных разведений антисыворотки и каждым из полученных растворов обрабатывают носитель. Для каждого из них проводят определение антигена с использованием серии стандартных растворов антигена в ожидаемом диапазоне физиологических концентраций. На основании полученных данных строят калибровочные кривые, при сравнении которых по таким параметрам, как угол наклона, пересечение с осью ординат и коэффициент корреляции, можно выбрать режим обработки, позволяющий получить оптимальное сочетание чувствительности и линейности ответа.

Подготовка носителя

Связывание антител с твердым носителем достигают путем «пассивной» адсорбции или «активной» ковалентной пришивки.

В случае «пассивной» адсорбции носитель в течение нескольких часов обрабатывают раствором соответствующих антител, при этом связывание антител с поверхностью носителя обеспечивается за счет гидрофобных взаимодействий. После такой обработки избыток антител отмывают, а носитель помещают в раствор альбумина (1—3%) или желатины (0,05—0,1%) для предотвращения неспецифической адсорбции конъюгата. Впервые этот процесс был описан в работе Кэта и Триджера (Catt, Tregear, 1967). Есть сообщение, что связывание белков с такими носителями, как полистирол, не зависит от pH и ионной силы используемого буфера (Czosignani et al., 1970), хотя в более ранних работах предполагали, что pH и ионная сила буфера могут влиять на конформацию белка и тем самым на прочность его связывания с носителем (Oreskes, Singer, 1961). Можно полагать, что наблюдаемое улучшение связывания белков в изоточке обусловлено минимизацией электростатического отталкивания между белковыми молекулами, плотно упакованными на поверхности носителя. Связывание белка с носителем зависит от концентрации, причем совместное влияние pH и ионной силы наиболее отчетливо проявляется при более высоких концентрациях белка в растворе. Так, если концентрация иммуноглобулинов ниже уровня насыщения поверхности полистирола, то при изменении pH от 4 до 9 связывание повышается на 10%, в то время как при более высоких, насыщающих, концентрациях изменение pH в том же диапазоне сопровождается увеличением адсорбции белка на 25%.

Связывание белков с полистирольным носителем непосредственно зависит от времени и температуры обработки. Так, при 37 °С связывание белка примерно вдвое больше, чем при 4 °С. Кроме того, при 3-часовой обработке уровень адсорбции белка достигает лишь 80% максимального значения, наблюдаемого после 36 ч инкубации (Cantarero et al., 1980).

Обработка носителя каким-либо «инертным» белком, например альбумином или желатиной, после его насыщения антителами позволяет заблокировать остаточные свободные центры связывания, с которыми могли бы неспецифически взаимодействовать молекулы конъюгата. Интересно, что по крайней мере в одном случае было показано, что иммуносорбент, полученный при обработке носителя альбумином, а затем антителами, оказывается столь же эффективным, что и при обработке в обычной последовательности (Standefer, Saunders, 1978).

Эффективность «пассивной» адсорбции можно повысить, если ввести дополнительную стадию предварительной обработки поверхности полистирола (Howell et al., 1981) или самих антител (Parsons, 1981). Так, оказывается, что предварительная обработка поверхности полистирола свежеразбавленным 2%-ным раствором глутарового альдегида при комнатной температуре в

течение 2 ч приводит к значительному повышению степени связывания антител. В альтернативном варианте глутаровым альдегидом обрабатывают непосредственно антитела: 400 мл 0,02 М глутарового альдегида добавляют к 2 л антисыворотки, разведенной 1 : 2000 при pH 6,0, и инкубируют 20 мин при 37 °С. После такой обработки степень связывания антител с полистиролом (экспозиция 1 ч, 37 °С) повышается в 2—5 раз.

Для сведéния к минимуму колебаний в содержании связанных антител иногда оказывается необходимым ковалентно связывать антитела с твердым носителем. Для этих целей в качестве носителя применяли латекс (Quash et al., 1978), нейлон (Hendry, Herrmann, 1980), а также сефарозу и целлюлозу (Bolton, Hunter, 1973). Обычно носитель предварительно обрабатывают с целью активации реакционноспособных центров, что позволяет осуществлять последующее ковалентное связывание антител. Так, высвобождения карбоксильных и аминогрупп на нейлоне можно достичь 24-часовой обработкой 3,5 М HCl (Hendry, Herrmann, 1980). Для ковалентной пришивки антител к целлюлозе или сефарозе эти матрицы активируют бромцианом (Bolton, Hunter, 1973).

Десорбция нековалентно связанных с носителем антител в ходе последующих стадий анализа значительно снижает его чувствительность и точность. Сообщалось, что на этих стадиях может десорбироваться до 40% исходно адсорбированных на носителе антител (Engvall et al., 1971). Однако в дальнейшем было показано, что процесс десорбции существенно зависит от времени и поддается контролю; при работе в оптимальном режиме общее количество десорбирующегося белка оказывается весьма незначительным (Howell et al., 1981; Cantarero et al., 1980). Когда полистирольные и стеклянные матрицы, покрытые IgG (80 мкг/мл), обрабатывали 0,6%-ным раствором альбумина в фосфатном буфере, содержащем 0,1% твина-20, наблюдали десорбцию лишь небольшой части адсорбированного белка (около 1,5% от 32 мкг); при этом основная доля белка десорбировалась за первые 48 ч (Howell et al., 1981). В тех случаях, когда налицо опасность десорбции, ее можно эффективно предотвратить, проведя предварительную обработку носителя глутаровым альдегидом (для полистирола) или производными силана (для стекла).

Результаты

Концентрация ферментного конъюгата

Одним из параметров, отражающих чувствительность ИФА, является разность между значениями оптической плотности исходного раствора (нулевой контроль без стандарта) и оптиче-

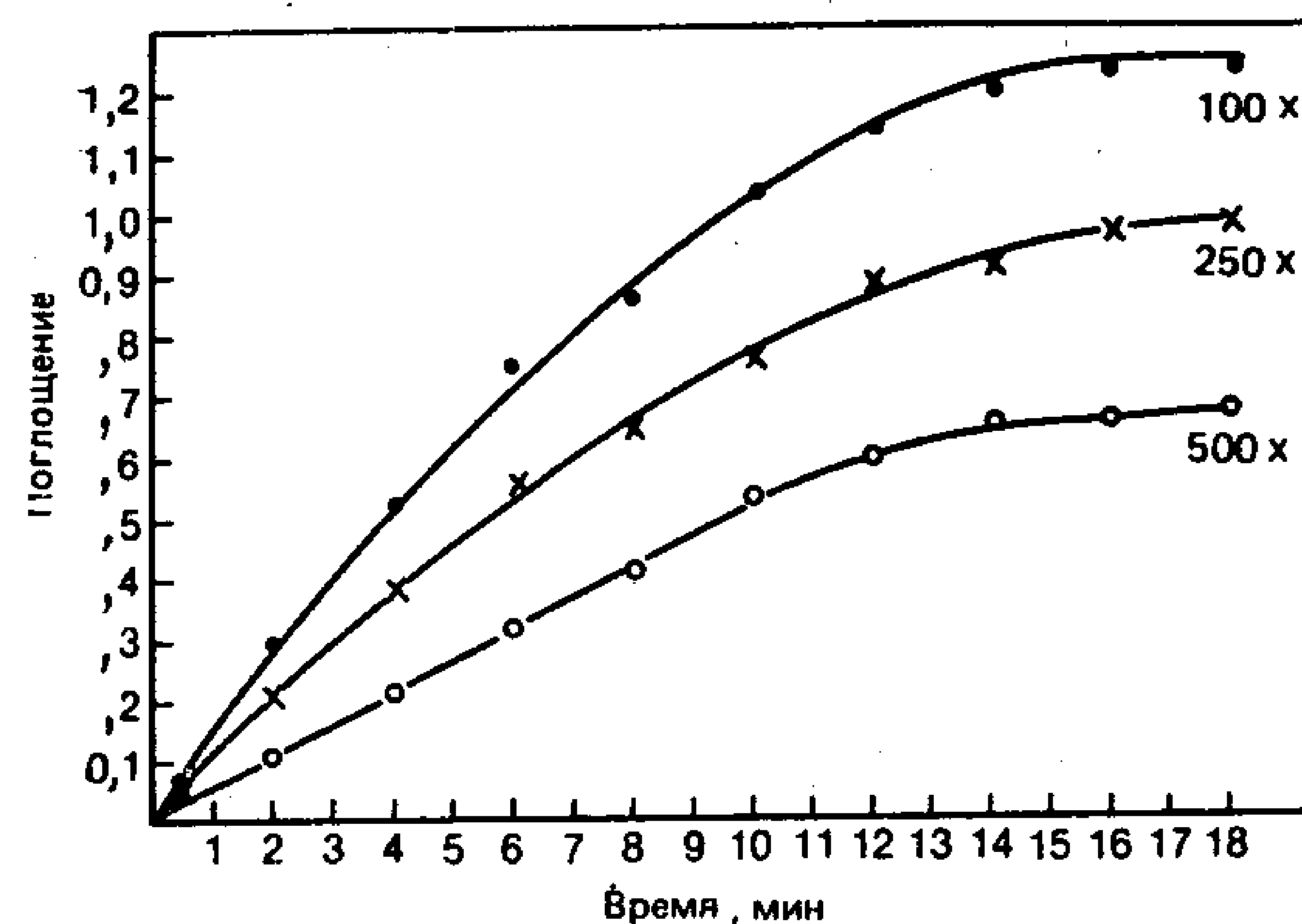


Рис. 12-6. Влияние разведения конъюгата на пероксидазную реакцию. Превращение субстрата происходит по линейному закону в течение первых 10 мин реакции при использовании конъюгата в разведении до 1 : 500. Подробности см. в тексте. Публикуется с разрешения Clinical Chemistry.

ской плотности в пробирке, соответствующей самой высокой концентрации стандарта (минимальное разведение в серии). Важным фактором, который может увеличить эту разность, является концентрация ферментного конъюгата в реакции. При слишком высокой концентрации конъюгата может происходить его избыточное неспецифическое связывание с носителем. В результате этого не исключено значительное повышение фона. При слишком низкой концентрации конъюгата в результате низкой скорости превращения субстрата в продукт может заметно снижаться чувствительность анализа. При инкубации конъюгата [пероксидаза—гентамицин] в трех различных разведениях с иммобилизованными на носителе антителами линейное превращение субстрата в течение 10 мин наблюдалось лишь для одного из разведений — 1 : 500 (рис. 12-6). При использовании двух других разведений, 1 : 100 и 1 : 250, кинетика превращения субстрата имела отчетливо нелинейный характер. Несомненно, при оптимизации процесса, повышая чувствительность анализа, следует стремиться не выходить за рамки кинетики нулевого порядка в отношении реакции, катализируемой индикаторным ферментом. Конечно, повышение концентрации конъюгата приведет к увеличению степени его связывания и соответственно к росту наблюдаемой ферментативной активности. Однако при слишком высоком содержании связавшегося фермента в ходе реакции будет происходить быстрое истощение субстрата, которое выразится в нелинейном изменении поглощения. На рис. 12-6 для кривой, соответствующей разведению конъюгата 1 : 500, эта нелинейность начинает проявляться после 10-й минуты. При более высоких концентрациях конъюгата нелинейность проявляется еще раньше и выражается более отчетливо.

Чувствительность

Одним из важнейших достоинств метода ELISA является его высокая чувствительность, которая достигается, как правило, за счет: а) очистки ферментного конъюгата, б) увеличения времени инкубации, особенно на стадии собственно ферментативной реакции и в) осуществления такой последовательности этапов, при которой антиген связывается с иммобилизованными на носителе антителами, а затем взаимодействует с добавляемыми на последней стадии конъюгированными антителами.

В препаратах конъюгатов, полученных ковалентным присоединением фермента к антителам, часто присутствует некоторый избыток свободного фермента. Наличие примеси свободного фермента может заметно снизить чувствительность анализа за счет неспецифического превращения субстрата. Удаление избытка фермента дает возможность значительно повысить уровень чувствительности. Так, чувствительность определения поверхностного антигена вируса гепатита В методом ELISA удалось повысить в 50 раз с помощью очистки конъюгата аффинной хроматографией и гель-фильтрацией (Porstmann et al., 1981).

Увеличение времени инкубации далеко не всегда приводит к повышению чувствительности определения. В каждом случае необходимо проверять, происходит ли при более длительной инкубации дальнейшее развитие окраски или ее ослабление, особенно в случае проведения реакции при повышенной температуре. Для уяснения вероятности ослабления окраски в ходе ферментативной реакции смесь стандартов с конъюгатом [пероксидаза — IgG] после завершения начальной фазы превращения субстрата длительно инкубировали при 25 и 37 °С. Как видно на рис. 12-7, после 30 мин инкубации при 37 °С развитие окраски практически прекращается, в то время как при 25 °С на этом же этапе окраска продолжает интенсивно нарастать.

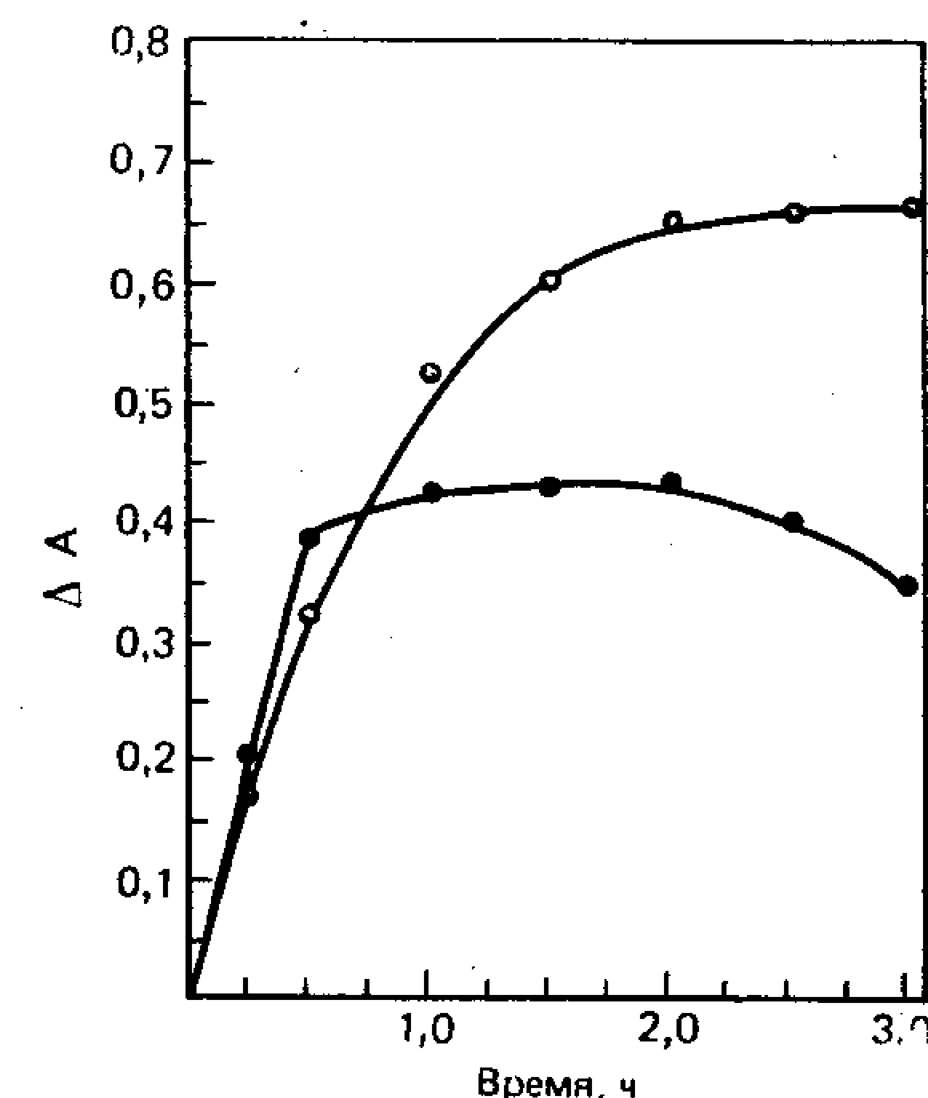


Рис. 12-7. Влияние температуры на превращение субстрата. Активность пероксидазы определяли при 25 °С (светлые кружки) и при 37 °С (темные кружки). Публикуется с разрешения Clinical Chemistry.

Характер влияния последовательности добавления реагентов на чувствительность анализа можно проиллюстрировать на примере, приведенном в табл.

Таблица 12-1. Сравнение результатов конкурентного и последовательного вариантов анализа хориогонадотропина

Образец, мМЕ/мл	Оптическая плотность	
	конкурентный анализ[1])	последовательный анализ[2])
0	0,028	0,040
10	0,048	0,118
50	0,100	0,294

[1]) Конкурентная инкубация в течение 1 ч.
[2]) Два последовательных (неконкурентных) этапа инкубации по 1 ч.

12-1. Значения оптической плотности в пробах, полученных при конкурентном определении хорионического гонадотропина человека (ХГТЧ) с инкубацией в течение 1 ч, сравнивали со значениями, полученными при последовательном (неконкурентном) анализе. В последнем случае те же реагенты добавляли в два этапа, на каждом из которых проводили 1-часовую инкубацию. Более низкие значения оптической плотности в случае конкурентного анализа, определяемые с меньшей точностью, свидетельствуют о том, что этот сравнительно быстрый метод менее надежен для анализа ХГТЧ в концентрации ниже 100 мМЕ/мл. В таком варианте конкурентного анализа за 1 ч инкубации не происходит достаточно интенсивного для точного определения небольших количеств ХГТЧ развития окраски. Чувствительность повышается в несколько раз, если увеличить добавляемое количество конъюгата, увеличить время реакции, повысить температуры инкубации от комнатной до 37 °C или уменьшить объем реагента, используемый для остановки реакции (Mailliavin et al., 1984).

Иммунные циркулирующие комплексы

Для ИФА, основанного на использовании конъюгатов фермента со вторыми видоспецифичными антителами, важное значение могут приобретать проблемы, связанные с циркулирующими иммунокомплексами. В качестве примера можно отметить анализ на содержание антител против двухцепочечной ДНК, в котором в роли индикаторного реагента используются конъюгированные с ферментом антитела к IgG человека. В ходе анализа индикаторный конъюгат образует «сэндвич» со связанным IgG (специфичным к ДНК). Если в сыворотке пациента присутствуют иммунокомплексы, в состав которых входит IgG, то в ходе проведения первой стадии реакции они могут сорбироваться на носителе и также взаимодействовать с индикаторным конъюгатом. За счет этого при определении специфических иммуноглобулинов может быть получен ложный положительный ответ.

Таблица 12-2. Влияние ультрацентрифугирования на удаление циркулирующих иммунокомплексов

Исследованные сыворотки	Глубина протекания реакции, %	
	контроль (без ДНК)	дцДНК
СГН[1])-сыворотка		
необработанная	102	100
после центрифугирования	18	17
СКВ[2])-сыворотка		
необработанная	106	100
после центрифугирования	22	68

[1]) Сыворотка больного стрептококковым гломерулярным нефритом, содержащая иммунокомплексы.
[2]) Сыворотка больного сывороточной красной волчанкой, содержащая иммунокомплексы.

Это явление проиллюстрировано в табл. 12-2 на примере сравнения данных анализа сыворотки двух больных. Анализировали сыворотки больного стрептококковым гломерулярным нефритом (СГН) и больного сывороточной красной волчанкой (СКВ). Анализ проводили методом ELISA на связанной с носителем дцДНК, используя в качестве индикаторного агента конъюгат антител к человеческому IgG с пероксидазой. Перед анализом часть препаратов сыворотки центрифугировали при 17 000 g в течение 10 мин для удаления иммунокомплексов. Если такую обработку препаратов обоих больных не проводили, то получали как в том, так и в другом случае отчетливый положительный ответ. Если же иммунокомплексы предварительно удаляли, то положительный ответ получали только для препаратов сыворотки больного СКВ.

При работе с конъюгатом на основе антител к IgG, безусловно, следует учитывать возможность возникновения ошибочных положительных ответов в результате взаимодействия с циркулирующими иммунокомплексами. В то же время последние сообщения свидетельствуют о том, что при проведении массовых анализов этого типа ложные положительные ответы в действительности наблюдаются крайне редко. Опубликованы две работы (Myers et al., 1984; Haugen et al., 1983), в которых описано применение метода ELISA для обнаружения антител к дцДНК у большого числа обследованных. Из 80 обследованных человек — потенциальных носителей синдрома СКВ — лишь двое дали ложные положительные ответы.

Обсуждение

Критическим фактором, определяющим успешное применение метода ELISA, является адсорбция антител на носителе. К эффективности и воспроизводимости процесса адсорбции, которые должны обеспечить достаточную чувствительность и свести к минимуму неспецифическое связывание на последующих этапах анализа, предъявляются высокие требования. Технические аспекты этого процесса могут представляться достаточно элементарными, и в то же время в силу его зависимости от ряда различных факторов не исключена плохая воспроизводимость результатов. Следует отметить, что поверхность любого носителя характеризуется определенной неравномерностью распределения гидрофобных участков. Так, на разных участках поверхности полистирола может находиться различное остаточное количество химического компонента, используемого в процессе получения таких участков. Наличие этого компонента может ослаблять связывание антител, поскольку при этом могут нарушаться гидрофобные взаимодействия, определяющие адсорбцию антител на полимере. Это приводит к колебаниям в количестве связывающегося с носителем белка (антител). К тому же даже адсорбировавшиеся антитела могут оказаться связанными весьма непрочно и теряться на последующих стадиях отмывки. Другим фактором, влияющим на эффективность связывания антител с поверхностью носителя, является их концентрация в растворе, контактирующем с носителем. Было показано, что степень связывания белка с полистиролом линейно зависит от содержания белка в растворе в диапазоне до 100 нг/см^2 (Pesce et al., 1977; Cantarero et al., 1980; Howell et al., 1981). При использовании растворов с более высоким содержанием белка на единицу поверхности эффективность адсорбции снижается и в результате бóльшее количество белка подвергается последующей десорбции. Наблюдаемое при этом ослабление прочности связывания объясняется, вероятно, своего рода «наслаиванием» избыточного белка на поверхность носителя. На последующих этапах анализа связавшиеся таким образом антитела сравнительно легко десорбируются (McClaren, 1981). Другое объяснение наблюдаемого ослабления прочности связывания антител основано на представлении о пространственной «напряженности», возникающей за счет взаимодействий между слишком тесно упакованными на поверхности носителя молекулами антител. Полагают, что подобная напряженность определяет нелинейность в изменении уровня связывания с носителем в области высоких концентраций антител (Parsons, 1981).

Поскольку прочность адсорбции белков существенно зависит от пространственных затруднений, возникающих при их плотной упаковке на поверхности носителя, интересно рассмотреть, как влияет на этот процесс предварительная очистка антисыворотки. При очистке антисыворотки удаляется часть балластных белков, благодаря чему повышается относительное содержание антител, которые могут быть адсорбированы на носителе. В этом отношении особое значение имеют два аспекта, связанные с процессом очистки антисыворотки. Во-первых, присутствие в антисыворотке белков в концентрации, не превышающей 1 мкг/мл, практически не сказывается на связывании антител с полистирольной матрицей (Cantarero et al., 1980), т. е. при очистке антител желательно достигнуть именно этого уровня содержания примесных белков. Во-вторых, известно, что большинство белков характеризуется приблизительно одинаковым сродством к полистиролу (Kenny, Dunsmoor, 1983). Отсюда следует, что качественный состав примесных белков, содержащихся в частично очищенной антисыворотке, имеет гораздо меньшее значение, чем их количественное содержание. Впрочем известны и исключения из этого правила. Фибриноген, например, обладает необычайно высоким сродством к полистиролу и поэтому может при связывании вытеснять антитела, адсорбированные на полистирольной поверхности (Morrissey, 1977). Таким образом, при очистке антител следует стремиться удалить бóльшую часть фибриногена, чтобы избежать его преимущественного, хотя и неспецифического, связывания с носителем.

Третьим фактором, снижающим эффективность ИФА, является нарушение связи антител с носителем в условиях хранения. В оптимальных условиях адсорбированные антитела остаются прочно связанными с носителем, при этом происходит высвобождение лишь незначительной доли суммарного связанного белка. В основном белок высвобождается в первые 48 ч, однако с меньшей скоростью это может продолжаться и в последующие 30 дней (Howell et al., 1981). Процесс высвобождения белка может ускоряться при изменении влажности или повышении температуры. Одним из проявлений таких неконтролируемых изменений в прочности связывания может оказаться плохая воспроизводимость в повторных пробах.

Важнейшим фактором, оказывающим непосредственное влияние на чувствительность анализа, является «удельная активность» ферментного конъюгата. Определив удельную активность в единицах количества субстрата, расщепляемого в единицу времени одним молем фермента в составе конъюгата, связанного с твердой фазой, можно сделать интересные расчеты. При проведении иммуноферментного анализа удобно работать в режиме, позволяющем получать приращение оптической плотности около 0,1 за 10 мин при конечном объеме реакционной смеси 1 мл. Это соответствует скорости изменения поглощения в диапазоне 0,01 опт. ед. в минуту. Для такого фермента, как щелочная фосфатаза, тестируемого по расщеплению *п*-нитрофенилфосфата, сформулированное требование соответствует при-

мерно 0,5 мМЕ фермента. Для большинства доступных препаратов фосфатазы это отвечает примерно 0,1 мкг, или 0,5 пмоль, фермента. Таким образом, для обеспечения оптимальной скорости прироста поглощения с антигеном должно связаться около 0,5 пмоль конъюгата. Исходя из предположения о примерном равенстве концентраций антигена и конъюгата, можно считать, что должно связываться также 0,5 пмоль антигена. Тогда, исходя из объема образца 0,1 мл, можно оценить возможности применения такого анализа для определения тех или иных антигенов. Например, 0,5 пмоль тироксина в 0,1 мл соответствует 4 нг/мл, что обеспечивает вполне реальную возможность его клинического тестирования. В то же время рассчитанный таким же образом предел чувствительности для дигоксина (3,8 нг/мл) заметно превышает его реальный клинический уровень. Очевидно, что наблюдаемая удельная ферментативная активность конъюгата в действительности зависит от целого ряда параметров. В их число входит: а) молярное соотношение фермент : антитело в конъюгате, б) степень очистки конъюгата, в) собственная удельная активность конъюгированного фермента, г) выбор субстрата для проведения индикаторной реакции. Чтобы достичь необходимой чувствительности, проводят эксперименты по оптимизации, варьируя каждый из этих параметров.

По-видимому, нет такого способа конъюгации, в котором наряду с эффективным и прочным связыванием антитела с ферментом гарантировалась бы полная сохранность и антигенной, и ферментативной активности обоих компонентов конъюгата. Использование любых реагентов для образования ковалентных связей между двумя белками неизбежно сопровождается возникновением внутримолекулярных сшивок, которые в свою очередь могут заметно влиять на соответствующие активности. Тем не менее, контролируя определенные факторы, удается уменьшить образование внутримолекулярных связей и тем самым повысить качество образующихся конъюгатов. Так, для получения достаточно активного конъюгата одностадийным методом с использованием глутарового альдегида необходимо, чтобы оба белковых компонента реагировали с глутаровым альдегидом примерно с одинаковой интенсивностью (Ford et al., 1978). Такого рода одинаковые реакционные способности у белков наблюдаются далеко не всегда. Выбор фермента для конъюгации может весьма существенно повлиять на сохранность антигенной и ферментативной активностей в образующемся конъюгате. Например, при связывании IgG с лактопероксидазой в конъюгате сохраняется до 21% антигенной активности, а при конъюгации с щелочной фосфатазой — лишь 1%. При этом в конъюгате с лактопероксидазой сохраняется 50% ферментативной активности, а в конъюгате с фосфатазой — около 70% (Engvall, Perlmann, 1971).

Независимо от выбора конкретного способа конъюгации следует контролировать молярное соотношение фермента и антител таким образом, чтобы максимальная чувствительность достигалась без потери антигенной активности конъюгата. Обычно включение более 1—2 молекул фермента на молекулу антитела сопровождается снижением общей антигенной активности конъюгата. В отличие от конъюгатов типа [антитело — индикаторный фермент], для которых оптимально эквимолярное соотношение, в конъюгатах типа [гаптен — фермент] оптимальным является высокое относительное содержание гаптена. Наиболее эффективное связывание достигается только тогда, когда на одну молекулу фермента приходится несколько молекул гаптена, что было продемонстрировано при тестировании кортизола (Comoglio et al., 1976), трииодтиронина (O'Sullivan et al., 1978) и эстрадиола (Exely, Abuknesha, 1978). В каждом случае оптимальное соотношение гаптен : фермент устанавливается эмпирически на основании сопоставления стандартных кривых, полученных с использованием конъюгатов с различным содержанием гаптена.

В пределах оптимального соотношения гаптен : фермент эффективность использования конъюгата в анализе существенно зависит от способа приготовления данного препарата. Важно избежать блокирования антигенных центров на поверхности гаптенов и антител. Потеря антигенных центров на какой-либо из молекул, естественно, приведет к снижению эффективности их использования в методе ELISA (Van-Weeman, Shuurs, 1976). Кроме того, осуществлять конъюгацию следует таким образом, чтобы ограничить возможность последующего так называемого «мостикового связывания» (bridge binging). Мостиковое связывание будет происходить в том случае, когда образуются антитела, специфичные к области ковалентной сшивки (мостика) гаптена с белком-носителем. Если в конъюгате [гаптен — фермент] имеется такая же химическая сшивка, что и в конъюгате [гаптен — белок-носитель], использованном при иммунизации, то в ходе проведения анализа методом ELISA антитела при связывании будут неравномерно распределяться между конъюгатом и свободным гаптеном. Это может существенно снизить чувствительность анализа. Ограничить влияние «мостикового связывания» можно, используя при получении конъюгата [гаптен — фермент] химические сшивки, отличные от присутствующих в конъюгате [гаптен — белок-носитель], против которого были синтезированы антитела.

Еще одним важным фактором, который следует учитывать при проведении любого ИФА, является так называемый «матричный эффект образца». Этот эффект может непосредственно и весьма существенно отражаться на точности анализа. Одним из наиболее очевидных примеров матричного эффекта является

наблюдаемый в области высоких концентраций загиб (hook), проявляющийся как в иммуноферментном, так и в радиоиммунологическом вариантах гетерогенного анализа (Miles et al., 1974). Загиб кривой отражает тот факт, что при очень высокой концентрации антигена по мере ее дальнейшего роста связывание меченного ферментом антигена начинает уменьшаться. Как полагают, этот эффект обусловлен изменением аффинности антител из-за их плотной упаковки на носителе (Parsons, 1981). При этом за счет отрицательной кооперативности на поверхности носителя может происходить снижение аффинности антител, приводящее к ухудшению связывания лигандов при высокой концентрации антигена. Эффекта отрицательной кооперативности можно избежать, если использовать для обработки поверхности носителя очищенные антитела с высокой аффинностью. Другое объяснение эффекта «загиба» в области высоких концентраций антигена основано на представлении о насыщении «первичных» антител. После того как насыщаются центры связывания «первичных» антител, характеризующихся наиболее высоким сродством к антигену, возрастает конкуренция за центры связывания антител с более низкой аффинностью. При добавлении дополнительных количеств антигена возрастающая конкуренция за центры связывания с низким сродством будет благоприятствовать смещению равновесия в пользу образования свободного комплекса [конъюгат — антиген]. Таким образом, добавление антигена будет вызывать диссоциацию связанного конъюгата, в результате чего при высоких концентрациях антигена может наблюдаться загиб стандартной кривой титрования антигена. Ни одна из этих гипотез не была подвергнута достаточно тщательной проверке. Следует отметить, что анализ методом ELISA не всегда сопровождается заметным эффектом «загиба» (Ngo et al., 1983), подобным тому, что был обнаружен, например, при тестировании ферритина (Anido, 1984). Однако в каждом случае рекомендуется контролировать линейность ИФА в области высоких концентраций антигена.

В последнее время метод ELISA в его стандартных вариантах широко применяется главным образом для идентификации специфических циркулирующих антигенов или антител, появляющихся в результате протекания инфекционных процессов. Однако известны и некоторые новые варианты применения, отражающие оригинальные подходы к адаптации методологии ELISA. Один из примеров — это иммунологический анализ с использованием аффинных колонок (Freytag et al., 1984). Эта методика основана на взаимодействии дигоксина, содержащегося в стандартном или опытном образце, с антидигоксиновыми антителами, конъюгированными с галактозидазой. Пробу наносят на колонку с аффинным сорбентом, который в качестве лиганда содержит уабаин, ковалентно пришитый к твердому

носителю. При прохождении пробы через колонку с уабаином связываются только свободные молекулы конъюгата. Комплекс конъюгата с дигоксином не задерживается сорбентом; после выхода с колонки его количество оценивают, проводя реакцию с субстратом индикаторного фермента — *о*-нитрофенил-1-β-D-галактопиранозидом. Количество образовавшегося продукта, *о*-нитрофенола, определяемое по поглощению при 405 нм, пропорционально концентрации дигоксина в исходном стандартном или опытном образце. Подобный подход был использован и для других лекарственных препаратов, включая теофиллин и хинидин.

Другим интересным подходом к адаптации метода ELISA является метод, основанный на последовательном погружении пластиковой палочки с адсорбированными антителами в серию растворов, содержащих различные реагенты. С использованием этого уже достаточно традиционного варианта метода ELISA исследуют взаимодействия адсорбированных на полимерной подложке антител к ХГТЧ со стандартным раствором ХГТЧ, а затем после отмывки — с ферментным конъюгатом. После второй отмывки палочку погружают в раствор субстрата для развития окраски. Интенсивность окраски, развивающейся на поверхности полимерной подложки, пропорциональна концентрации ХГТЧ в образце. Использование такого рода пластиковых палочек-подложек в качестве твердой фазы в ИФА облегчает осуществление целого ряда манипуляций, необходимых для проведения анализа. В практику клинических лабораторий входят и другие варианты ИФА (в том числе основанные на применении моноклональных антител), позволяющие значительно повысить избирательность и чувствительность неизотопных методов иммунологического тестирования.

Несмотря на то что основные экспериментальные приемы метода ELISA были разработаны уже более 15 лет назад, в клинических лабораториях его стали применять недавно, только после того, как он стал надежен и прост в исполнении. Разработанные новые варианты метода, в которых сохраняются такие важные его характеристики, как чувствительность, относительная независимость от матричных эффектов и сравнительная простота, включают также некоторые дополнительные преимущества, например автоматизацию процесса. Без сомнения, в ближайшие годы появятся новые методические варианты, применение которых будет базироваться на четком контроле всех важных параметров, таких, как специфичность антител, подготовка носителя, стабильность конъюгата, чувствительность определения. Благодаря этому подобные методики удастся легко адаптировать для работы в клинической лаборатории.

Литература

Anaokar S., Garry P. J., Standefer J. C. (1979). Solid-phase enzyme immunoassay for serum ferritin, Clin. Chem., **25**, 1426—1431.
Anido G. (1984). Seven ferritin kits compared with respect to the «Hook» effect, Clin. Chem., **30**, 500.
Avrameas S. (1969). Enzyme immunoassays and related techniques: Development and limitations, Immunochemistry, **6**, 43—52.
Bolton A. E., Hunter W. M. (1973). The use of antisera covalently coupled to agarose, cellulose, and sephadex in radioimmunoassay systems for proteins and haptens, Biochemic. et Biophysica Acta, **329**, 318—330.
Cantarero L. A., Butler J. E., Osborne J. W. (1980). The adsorptive characteristics of proteins for polystyrene and their significance in solidphase immunoassays, Anal. Biochem., **105**, 375—382.
Catt K. J., Tregear G. W. (1967). Solid-phase radioimmunoassay in antibody-coated tubes, Science, **158**, 1570—1572.
Comoglio S., Çelada F. (1976). An immunoenzymatic assay of cortisol using *E. coli* β-galactosidase as label, J. Immunol. Methods, **10**, 161—170.
Crosignani P. G., Nakamura R. M., Hovland D. N., Mishell D. R., Jr. (1970). A method of solid phase radioimmunoassay utilizing polypropylene discs, J. Clin. Endocrinol. Metab., **30**, 153—160.
Elder E. M., Brown A., Remington J. S., Shonnard J., Naot Y. (1983). Microenzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin G and immunoglobulin M antibodies to *Legionella pneumophila*, J. Clin. Microbiol., **17**, 112—121.
Engvall E., Perlmann P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G, Immunochemistry, **8**, 871—874.
Engvall E., Carlsson H. E., 1976. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. In: First International Symposium on Immunoenzymatic Techniques INSERM Symposium No. 2 (Feldman et al., eds.), North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
Exely D., Abuknesha R. (1977). A highly sensitive and specific enzyme-immunoassay method for oestradiol-17-B, FEBS Letters, **91**, 162—165.
Ford D. J., Radin R., Pesce A. J. (1978). Characterization of glutaraldehyde coupled alkaline phosphatase-antibody and lactoperoxidase-antibidy conjugates, Immunochemistry, **15**, 237—243.
Franco E. L., Walls K. W., Sulzer A. J., Soto J. C. (1983). Diagnosis of acute acquired toxoplasmosis with the enzyme-labelled antigen reversed immunoassay for immunoglobulin M antibodies, J. Immunoassay, **4**, 373—393.
Freytag J. W., Dickinson J. C., Tseng S. Y. (1984). A highly sensitive affinity-column-mediated immunometric assay, as exeplified by digoxin, Clin. Chem., **30**, 417—420.
Fu P. C., Vodian M., Balga M., Zie V., Haden B. (1983). Performance characteristics of a competitive solid phase enzyme immunoassay for serun Digoxin, Clin. Chem., **29**, 1012.
Haugen B. R., Ginsburg W. W., Markowitz H. (1983). An ELISA microplate assay for IgG and IgM antibody to ss- and ds-DNA, Clin. Chem., **29**, 1212—1213.
Hendry R. M., Herrman J. E. (1980). Immobilization of antibodies on nylon for use in enzyme-linked immunoassay, J. Immunol. Methods, **35**, 285—296.
Hill H. R., Matsen J. M. (1983). Enzyme-linked immunosorbent assay and radioimmunoassay in the serologic diagnosis in infectious diseases, J. Infect. Dis., **147**, 258—263.
Howell E. E., Nasser J., Schray K. J. (1981). Coated tube enzyme immunoassay: Factors affecting sensitivity and effects of reversible protein binding to polystyrene, J. Immunoassay, **2**. 205—225.
Ishaq M.. Rashid A. (1983). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to extractable nuclear antigens in systemic lupus erythematous, with nylon as solid phase, Clin. Chem., **29**, 823—827.

Tsozaki M., Kuno-Sakai H., Kimura M. (1982). Simple enzyme-linked immunosorbent assay of mumps antibody for evaluation of immune status before and after vaccination, N. Engl. J. Med., **307**, 1456.
Kato K., Hamguchi Y., Fukui H., Ishikayawa E. (1975). Enzyme-linked immunoassay; I. Novel method for synthesis of the Insulin-β-D-galactosidase conjugate and its applicability for insulin assay, J. Biochem., **78**, 235—237.
Kenny G. E., Dunsmoor C. L. (1983). Principles, problems, and strategies in the use of antigenic mixtures for the enzyme-linked immunosorbent assay, J. Clin. Microbiol., **17**, 655—665.
Kunkel S. L., Manderino G. L., Marasco W., Kaercher K., Hirata A. A., Ward P. A. (1983). A specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of human C5a antigen, J. Immunol. Methods, **62**, 305—314.
Lucertini S., Valcavi P., Mutti A., Franchini I. (1984). Enzyme-linked immunosorbent assay of retinol-binding protein in serum and urine, Clin. Chem., **30**, 149—151.
Mailliavin A., Beaudonnet A., Pichot J., Revenant M. C. (1984). Improvement of a Commercial EIA Kit for determination of serum B-Choriogonadotropin, Clin. Chem., **30**, 597—598.
McClaren M. L., Lillywhite J. E., Andrew C. S. (1981). Indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): Practical aspects of standardization and quality control, Med. Lab. Sciences, **38**, 245—251.
Miles L. E. M., Lipschitz D. A., Bieber C. P., Cook J. D. (1974). Measurement of serum ferritin by a 2-site immunoradiometric assay, Anal. Biochem., **61**, 209—224.
Morrissey B. W. (1977). The adsorption and conformation of plasma proteins: A physical approach, Ann. N. Y. Acad. Sci., **283**, 50—64.
Myers B., Manganaro C., Rippe D. (1984). A micro ELISA for the quantitative detection of antibodies to double stranded DNA, Clin. Chem., **30**, 986.
Nakane P. K., Kawaoi A. (1974). Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation, J. Histochem. Cytochem., **22**, 1084—1091.
Ngo R. H., Brown B. A., Valdes R., Jr. (1983). Three commercial methods for serum ferritin compared and the high-dose «Hook Effect» eliminated, Clin. Chem., **29**, 1109—1113.
Oreskes I., Singer J. M. (1961). The mechanism of particulate carrier reactions. I. Adsorption of human-globulin to polystyrene latex particles, J. Immunol., **86**, 338—344.
O'Sullivan M. J., Gnemmi E., Morris D., Chieregatti G., Simmons M., Simmonds A. D., Bridges J. W., Marks V. (1978). A simple method for the preparation of enzyme-antibody conjugates, FEBS Lett., **95**, 311—313.
O'Sullivan M. J., Bridges J. W., Marks V. (1979a). Enzyme immunoassay: A review, Annals Clin. Chem., **16**, 221—240.
O'Sullivan M. J., Gnemmi E., Morris D., Chieregatti G., Simmonds A. D., Simmons M., Bridges J. W., Marks V. (1979b). Comparison of two methods of preparing enzyme-antibody conjugates: Application of these conjugates for enzyme immunoassay, Anal. Biochem., **100**, 100—108.
Parsons G. H., Jr., 1981. Antibody-coated plastic tubes in radioimmunoassay. In: Methods in Enzymology (Langone J. and H. Van Vunakis, eds.), Academic Press, New York, Vol. 73.
Pesce A. J., Ford D. J., Gaizutis M., Pollak V. E. (1977). Binding of protein to polystyrene in solid-phase immunoassays, Biochimica et Biophysica Acta, **492**, 399—407.
Porstmann T., Porstmann B., Schmechta H., Nugel E., Seifert R., Grunow R. (1981). Effect of IgG-horseradish peroxidase conjugates purified on Con A-Sepharose upon sensitivity of emzyme immunoassay, Acta. Biol. Med. Germ., **40**, 849—859.
Quash G., Roch A., Niveleaus A., Grange J., Keolouangkhot T., Huppert J. (1978). The preparation of latex particles with covalently bound polyamines, IgG and measles agglutinins and their use in visual agglutination tests, J. Immunol. Methods, **22**, 165—174.

Rathnam P., Saxena B. B. (1984). A «Sandwich» solid-phase enzyme immunoassay for lutropin in urine, Clin. Chem., **30**, 665—671.
Roman S. H., Korn F., Davies T. F. (1984). Enzyme-linked immunosorbent microassay and hemagglutination compared for detection of thyroglobulin and thyroid microsomal auto-antibodies, Clin. Chem., **30**, 246—251.
Sada E., Ruiz-Palacios, Lorez-Vidal, Ponce de Leon (1983). Detection of micobacterial antigens in cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis by enzyme-linked immunosorbent assay, Lancet, **2**, 651—652.
Sarafian S. K., Young H. (1982). Detection of gonococcal antigens by an indirect sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, J. Med. Microbiol., **15**, 541—550.
Shinomiya Y., Kato N., Imazawa M., Miyamoto K. et al. (1982). Enzyme immunoassay of the myelin basic protein, J. Neurochem., **39**, 1291—1296.
Standefer J. C., Saunders G. C. (1978). Enzyme immunoassay for gentamicin, Clin. Chem., **24**, 1903—1907.
Sun M., Novotny M., Doss R. C. (1983). A nonisotopic immunoassay for human prolactin, Clin. Chem., **29**, 1240.
Van Weeman B. K., Schuurs A. H. W. M., 1976. Sensitivity and specificity of hapten enzyme-immunoassays. In: First International Symposium of Immunoenzymatic INSERM Symposium (Feldman et al., eds.), North-Holland Publishing Company, Amsterdam, No. 2.
Verdon B., Mandel T., Berger E. G., Fey H. (1982). A solid-phase ELISA for human galactosyl-transferase, J. Immunol. Methods, **55**, 27—33.
Voller A., Bidwell D. E., Bartlett A. (1976). Enzyme immunoassays in diagnostic medicine; Theory and practice, Bull. World Health Organ., **53**, 55—65.
Wilson M. B., Nakane P., 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Immunofluorescence and Related Staining Techniques (Knapp et al., eds.), North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
Yorde D. E., Sasse E., Wang T., Hussa R., Garancis J. (1976). Conjugative enzyme linked immunoassay with the use of soluble enzvme/antibody immune complexes for labeling. I. Measurement of human choriogonatropin, Clin. Chem., **22**, 1372—1377.

Глава 13

Иммуноферментный анализ антител

Сеймур П. Халберт и Тсу-Минг Лин

Обнаружение специфических антител в физиологических жидкостях играет важную роль в клинической диагностике широкого круга заболеваний как инфекционного, так и аутоиммунного характера. Для этих целей был разработан ряд разнообразных методик, в том числе основанных на фиксации комплемента, пассивной гемагглютинации, ингибировании вирусной гемагглютинации, иммунофлуоресценции и латексной агглютинации. Применение этих методик для количественных определений требует титрования в сериях разведений. Недостатками подобных методик являются трудоемкость, невысокая точность и значительный элемент субъективизма, связанного с тем, что, как правило, нелегко отличить с достаточной надежностью слабую положительную реакцию от отрицательной. Благодаря развитию иммуноферментного анализа, в частности сэндвич-методов анализа типа ELISA (Engvall, Perlmann, 1972), появилась возможность проводить количественные измерения в широком диапазоне концентраций с использованием лишь единичного разведения сыворотки или плазмы. Эти методы позволяют также легко различать по активности антитела, принадлежащие к разным классам иммуноглобулинов. Объективность количественных оценок обеспечивается инструментальным фотометрированием; при этом интенсивность регистрируемых сигналов непосредственно коррелирует с уровнем тестируемых антител. При правильном подборе соответствующего антигена, связываемого с носителем, и подходящего антииммуноглобулинового конъюгата, содержащего ферментную метку, можно создать системы тестирования множества различных антител, основанные на одном и том же наборе манипуляций.

В нашей лаборатории был разработан ряд подобных тестов для определения человеческих антител, которые могут быть использованы для диагностики различных аутоиммунных и инфекционных заболеваний (табл. 13-1). В данной главе мы рассмотрим некоторые общие принципы оптимизации таких тест-систем. В отдельных случаях эти принципы будут проиллюстрированы на примере некоторых конкретных систем из числа приведенных в табл. 13-1.

Таблица 13-1. **Диагностические сэндвич-варианты иммуноферментного анализа для определения антител, разработанные в Кордис лаборэториз**

Категория заболевания	Тест на антитела к	Название теста	Заболевание	Единицы измерения	Источник данных
Аутоиммунные заболевания	IgG (ревматоидный фактор)	CORDIA RF	Ревматоидный артрит	МЕ/мл[1]	Halbert et al., 1980
	ДНК	CORDIA N	Системная красная волчанка	»	Halbert et al., 1981
	нуклеопротеину	CORDIA NP	Системная красная волчанка и волчанка, индуцированная лекарствами	»	Halbert et al., 1981
	тиреоглобулину	CORDIA TG	Тиреоидит и др. заболевания щитовидной железы	% от положительного контроля	Halbert et al., 1983
	иммунокомплексам	CORDIA IC	Различные заболевания	мкг экв/мл IgG	Lin et al., 1983
Инфекционные заболевания	вирусу краснухи (IgG)	CORDIA R	Краснуха	МЕ/мл	Kleeman et al., 1983
	Toxoplasma gondii (суммарный Ig)	CORDIA T	Токсоплазмоз	»	Lin et al., 1980
	Toxoplasma gondii (IgM)	CORDIA T-M	Активный острый токсоплазмоз	% от положительного контроля	Lin et al., 1984
	цитомегаловирусу (IgG)	CORDIA CMV	Инфекция цитомегаловирусом	То же	Kiefer et al., 1983
	вирусу простого герпеса	CORDIA HS	Инфекция вирусом простого герпеса	»	Kiefer, 1984
	Entamoeba histolytica	CORDIA A	Амебный абсцесс и дизентерия	»	Lin et al., 1981
	гетерофильному антигену Пауля — Бюннелла	CORDIA IM	Инфекционный мононуклеоз	»	Halbert et al., 1982

[1]) МЕ/мл — международные единицы/мл по стандартам сравнения ВОЗ.

Иммобилизация антигена на носителе

Во всех рассматриваемых тест-системах в качестве твердофазного носителя, или подложки, использовали небольшие диски с изотиоцианатными группами на поверхности, с помощью которых ковалентно пришивают белки или иные антигены. Антигены, химически связанные с поверхностью таких дисков, можно лиофилизовать и хранить при 4 °C в присутствии осушителя. В тех случаях, когда специально проверяли стабильность подобных препаратов при длительном хранении, было установлено, что при хранении в таких условиях существенного изменения свойств не происходит на протяжении 4 лет и более. Ковалентный способ иммобилизации обладает рядом преимуществ: для него характерно равномерное распределение антигена по поверхности и почти полное предотвращение его вымывания с поверхности носителя в свободную фазу при проведении анализа. Если у применяемого способа таких преимуществ нет, то возникают серьезные проблемы при использовании антигенов, нековалентно адсорбированных на поверхности носителя (Chessum, Denmark, 1978).

Требования к чистоте антигена

По-видимому, нецелесообразно использовать совершенно неочищенные препараты антигена, при иммобилизации которых с анализируемыми антителами будет взаимодействовать лишь незначительная часть связавшегося с поверхностью носителя материала. И хотя для получения удовлетворительных результатов в тестах рассматриваемого типа высокоочищенные препараты антигена, как правило, необязательны, известно, что с повышением степени очистки исходного антигена в определенных пределах повышается и эффективность анализа. При диагностировании инфекционных заболеваний следует также иметь в виду, что при той или иной инфекции в иммунном ответе могут участвовать различные схемы взаимодействия антиген — антитело. При этом некоторые из них имеют большее, а другие меньшее значение.

Степень очистки антител, содержащих ферментную метку

Требования, предъявляемые к чистоте препаратов антител для создания достаточно эффективной системы тестирования, также не слишком высоки. Однако и в этом случае ясно, что удовлетворительные результаты не могут быть получены, если уровень антител данной специфичности в препарате слишком низок и основная масса меченых иммуноглобулинов представ-

ляет собой фактически неактивный балласт. По нашему опыту наилучших результатов удается достичь с иммуноспецифически очищенными антителами, которые мы и применяли в своих тест-системах. После наработки антисыворотки, специфичной к данному классу иммуноглобулинов, глобулиновую фракцию пропускали через колонку с иммобилизованным чистым исходным иммуноглобулиновым антигеном. Очищенные антитела получали после тщательного промывания колонки и элюции при низком pH.

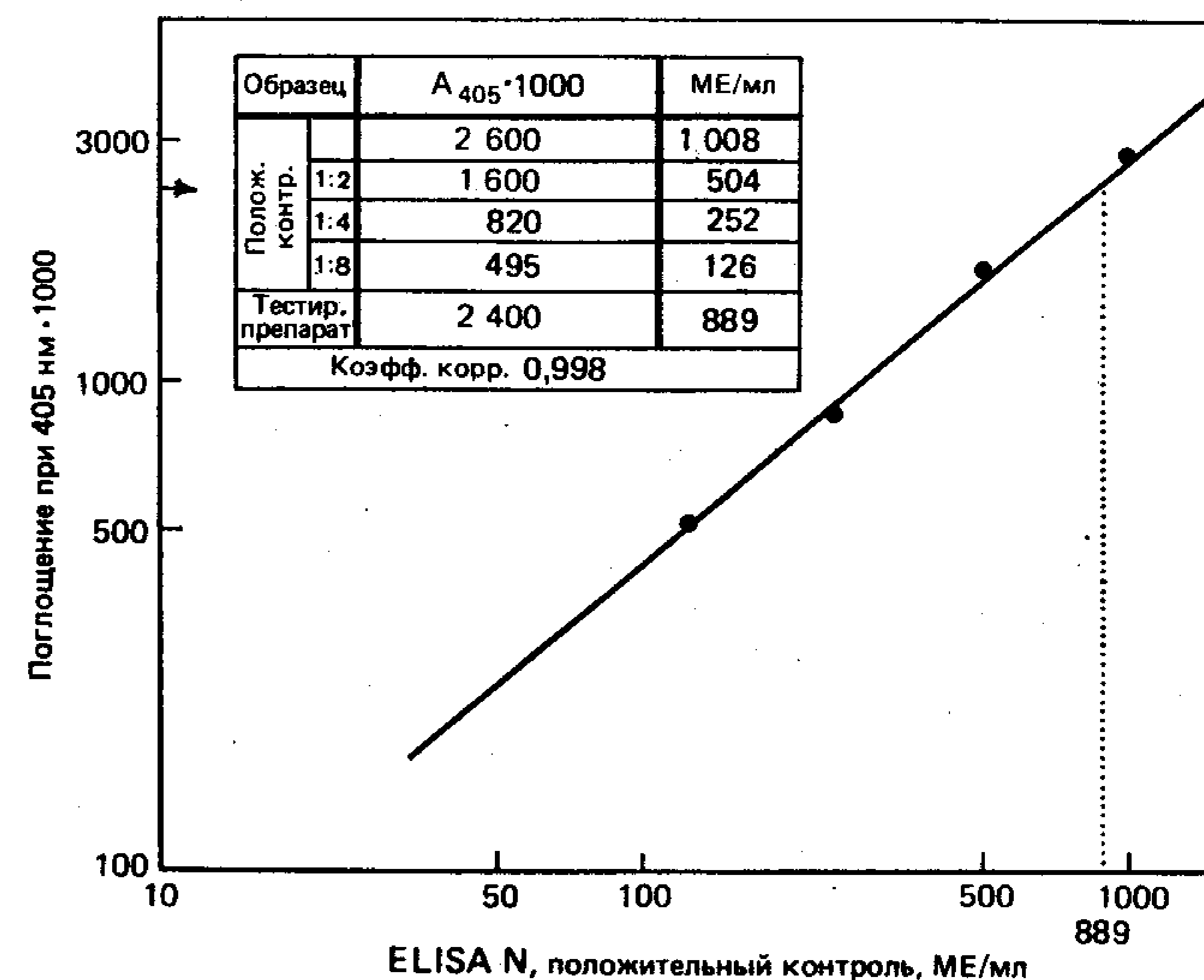
В качестве ферментной метки мы использовали щелочную фосфатазу из кишечника теленка. Этот фермент был выбран благодаря его относительно высокой каталитической активности, а также значительной стабильности как субстрата (*n*-нитрофенилфосфата), так и продукта его расщепления (*n*-нитрофенола). К тому же известно, что эти вещества не канцерогенны в отличие от ряда субстратов для широко используемой в качестве ферментной метки пероксидазы. В частности в Национальном институте рака на трех моделях было показано, что популярный субстрат пероксидазы — *о*-фенилендиамингидрохлорид — вызывает рак у лабораторных животных (Weisburger et al., 1978). Этот субстрат к тому же весьма нестабилен, и поэтому его следует использовать непосредственно после растворения, желательно в темноте.

Методика анализа

В типичном анализе используют, как правило, три инкубационных периода от 10 до 45 мин при 37 °С и разведения тестируемой сыворотки в диапазоне 1 : 50—1 : 100. Например, в тест-системе CORDIA N диски со связанной ДНК сначала инкубируют 45 мин с 0,5 мл анализируемой сыворотки в разведении 1 : 100. После отмывки их инкубируют 45 мин с раствором антител, содержащих ферментную метку, снова отмывают и вновь инкубируют 20 мин с 1 мл раствора субстрата. Реакцию останавливают добавлением 0,1 мл 3 М NaOH и измеряют поглощение при 405 нм.

Обработка результатов анализа

Даже при использовании одного определенного набора реагентов нельзя полностью исключить колебаний в значениях оптической плотности, регистрируемых при работе с различными препаратами, в разных лабораториях и даже в одной лаборатории в разные дни. Это может быть вызвано незначительными отклонениями по таким параметрам анализа, как температура инкубации, пипетируемые объемы, концентрация субстрата и т. п. В связи с этим возникает потребность в



Образец		A_{405}·1000	МЕ/мл
Полож. контр.		2 600	1 008
	1:2	1 600	504
	1:4	820	252
	1:8	495	126
Тестир. препарат		2 400	889
Коэфф. корр. 0,998			

Рис. 13-1. Типичная стандартная кривая при тестировании антител против ДНК методом CORDIA N. Коэфф. корр. — коэффициент корреляции значений поглощения и содержания антител в препарате (МЕ/мл) (Halbert et al., 1981).

независимой стандартизации каждой серии анализов. Исходя из известной высокой стабильности препаратов антител (Janeway et al., 1967), мы разработали способ стандартизации теста по эталонному препарату сыворотки.

В тех случаях, когда имеются соответствующие стандартные препараты Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), уровень антител данной специфичности в тестируемых образцах выражают в МЕ/мл, прибегая всякий раз к построению соответствующей стандартной кривой. Такую кривую строят на основании данных по измерению поглощения для неразбавленной стандартной положительной сыворотки и трех ее последовательных разведений. По счастью, в достаточно широком концентрационном диапазоне в двойных логарифмических координатах практически всегда наблюдается линейная зависимость сигнала (в МЕ/мл) от оптической плотности. Это видно на примере стандартной кривой для тест-системы определения аутоиммунных антител к ДНК, построенной по данным серии двукратных разведений стандарта (рис. 13-1). Коэффициент корреляции между значениями поглощения и МЕ/мл очень высок, как правило, он достигает величины >0,995. Помимо обычного графического анализа, проиллюстрированного на рис. 13-1, результаты тестирования можно интерпретировать с помощью обсчета на ручном калькуляторе (зависимость типа lg—lg).

В тест-системах, для которых еще не введены международные стандарты, в качестве стандартных препаратов используют образцы первичной положительной сыворотки, сохраняемой в аликвотах при —70 °С. В таких системах не относят условные единицы к положительному контролю и не строят стандартных кривых. Вместо этого, для простоты, результаты определения относят к поглощению соответствующего стандартного положительного контроля. Значение поглощения, получаемое для тестируемого образца, делят на поглощение в положительном контроле, умножают на 100 и таким образом выражают искомую величину в % от положительного контроля. Для каждого нового набора реагентов подбирают разведение положительного контроля таким образом, чтобы при тестировании он давал результаты, максимально близкие к первичной стандартной сыворотке. Качество работы тест-системы, полностью укомплектованной необходимыми реактивами и контрольными образцами, дополнительно проверяют на серии препаратов положительных и отрицательных сывороток, так же как это делается в тест-системах с использованием стандартов ВОЗ.

Для каждой системы необходимо установить величину порогового уровня, позволяющую надежно различать сигналы, соответствующие нормальным (т. е. отрицательным) и аномальным (т. е. положительным) образцам сыворотки. С этой целью методом ELISA в подобранных стандартных условиях тестируют широкий набор препаратов сыворотки, которые по данным других общепринятых методов анализа не содержат искомых антител. Обычно за величину порогового уровня, разделяющего нормальные и аномальные сыворотки, принимают полученное в подобной серии тестов среднее значение, плюс 2—3-кратное значение стандартного отклонения S. В некоторых случаях разрыв между сигналами нормальных и аномальных препаратов оказывается настолько велик, что в качестве порогового уровня можно использовать среднее значение в серии отрицательных контролей $+4S$. Это наблюдалось при работе с системами для тестирования инфекционного мононуклеоза (гетерофильные антитела Пауля — Бюннелла) и определения антител, специфичных к тиреоглобулину. Было установлено, что для некоторых тестов имеет смысл выделять некоторую область пограничных (промежуточных) значений, которые нельзя с уверенностью отнести ни к нормальным, ни к аномальным.

Иногда при проведении тестов, основанных на сравнении образцов сыворотки, соответствующих острому периоду заболевания и этапу выздоровления, с целью установления этиологии инфекции у данного больного клинические образцы оказываются малодоступными в силу самой природы заболевания. Однако и в этом случае удается добиться воспроизводимости результатов анализа в диапазоне 5—10% коэффициента вариации. На этом основании, а также после введения дополнительного фактора для учета технических ошибок можно надежно установить различия в значениях, полученных методом CORDIA, которые отражают изменения в совместно анализируемых образцах сыворотки, соответствующих острому периоду заболевания и этапу выздоровления.

Время инкубации

Вероятно, ввиду того, что все использованные реагенты были достаточно хорошо очищены, во всех методиках, перечисленных в табл. 13-1, оказалось возможным использовать относительно небольшие периоды инкубации. Для большинства тестов первые два периода инкубации составляли 30—45 мин, а инкубация с субстратом — 20—30 мин. В некоторых случаях, таких, как тестирование инфекционного мононуклеоза и тиреоглобулиновых антител, время инкубации удавалось очень существенно сократить (три периода до 10 мин). В случае тестирования тиреоглобулиновых антител для некоторых отчетливо положительных образцов даже за такие сокращенные периоды инкубации оптическая плотность достигала высоких значений вплоть до 3,5. При этом фоновое поглощение для образцов нормальной сыворотки составляло в среднем около 0,02. Такая высокая реакционная способность наблюдалась несмотря на стократное разведение тестируемых образцов.

Соотнесение с результатами других анализов

Почти во всех случаях количественные результаты, полученные методом CORDIA (ELISA), хорошо совпадали с результатами определения соответствующих антител другими методами. В качестве примера на рис. 13-2 приведено сравнение результатов определения ревматоидного фактора (РФ) методами латексного титрования и CORDIA RF, для которых коэффициент корреляции составляет 0,94 при $p<0{,}001$. Можно заметить, что многие из образцов сыворотки (в данном случае — семь) в методе ELISA характеризуются как положительные с низким уровнем тестируемых антител, а в методе латексной агглютинации — как отрицательные. Для каждого из этих образцов истинно положительный характер по отношению к ревматоидному фактору был дополнительно подтвержден. Это делали посредством блокирования иммунных реакций после преинкубации с человеческим IgG, который подвергали предварительной тепловой обработке. Аналогичная преинкубация с нативным IgG не сказывалась на результатах последующего тестирования этих образцов методом CORDIA RF. Для всех сравнений этого типа наблюдались высокие значения коэффициента корреляции, ко-

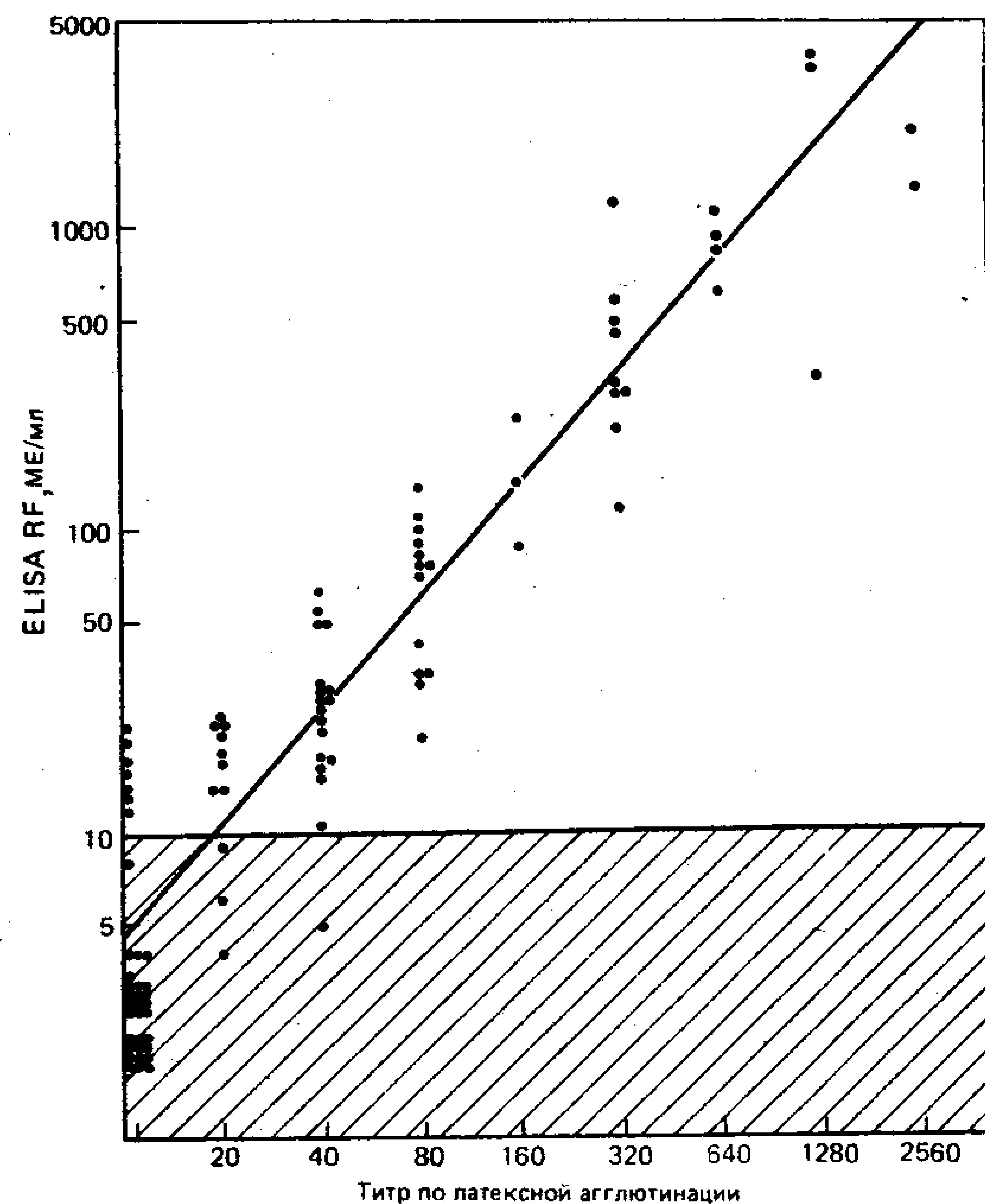


Рис. 13-2. Корреляция результатов количественного латексного титрования ревматоидного фактора (РФ) и значений анализа ELISA RF для 100 образцов сыворотки больных и здоровых. Коэффициент корреляции $(r) = 0{,}94$. Заштрихована область, соответствующая отсутствию патологии (Halbert et al., 1981).

торые, однако, оказывались несколько ниже обычного в тех случаях, когда метод анализа, с которым проводилось сравнение, был более сложным и (или) менее воспроизводимым.

Фоновая активность

В той или иной степени с проблемой фоновой активности приходится сталкиваться практически во всех работах по ИФА антител. Это связано как с чрезвычайно высокой чувствительностью самого метода, так и с тем, что для сыворотки характерен очень высокий уровень содержания иммуноглобулинов, в особенности IgG. Во время инкубации дисков, несущих иммобилизованные антигены, непосредственно с конъюгатом или после их предварительной инкубации в растворе, которым разводят пробы, неспецифического связывания ферментной метки практически не происходит. Вместе с тем при инкубации с образцами сыворотки, которые, предположительно, не содержат

антител с данной специфичностью, как правило, небольшие количества конъюгата неспецифически связываются как с поверхностью дисков, так и со стенками пробирки. Влияние такого неспецифического связывания на результаты анализа удается свести к минимуму, работая с достаточно высокими разведениями тестируемой сыворотки (1 : 50 или 1 : 100) и проводя реакцию с субстратом только после перенесения диска на последней стадии в чистую пробирку. Этому способствует также уменьшение времени инкубации, например в случае анализа антитиреоглобулиновых антител. Для антител класса IgM проблема неспецифического связывания выражена в значительно меньшей степени (в системе диагностики инфекционного мононуклеоза или определения ревматоидного фактора).

Определение антител данного класса

В ряде разработанных тест-систем общее содержание иммуноглобулинов данной специфичности определяют, пользуясь смесью меченных ферментом антител против IgG и IgM, не обладающих выраженной специфичностью к тому или иному типу тяжелых цепей. В некоторых случаях удается определить уровень IgM и IgG по отдельности, вводя в систему ферментные конъюгаты антител, специфичных только к тяжелым цепям соответствующего класса. В качестве примера в табл. 13-2 приведены результаты независимого определения уровня содержания IgG и IgM, специфичных к ДНК и ДНП, в сыворотке нескольких больных системной красной волчанкой (Karsh et al., 1982). Видно, что наблюдаются значительные различия в содержании IgG и IgM против этих аутоантигенов. Так, у больного 1 наблюдается достаточно высокий уровень

Таблица 13.2. Определение антител классов IgG и IgM, специфичных к ДНК и ДНП, у больных системной красной волчанкой

Больной	Антитела к ДНК, МЕ/мл		Антитела к ДНП, МЕ/мл	
	IgG N<89[1]	IgM N<163	IgG N<24	IgM N<28
1	282	609	38	93
2	864	55	41	18
3	85	39	1 162	20
4	48	51	427	613
5	1 988	451	771	102
6	4 515	2 976	1 962	1 729
7	3 966	125	634	176
8	660	213	1 928	31

[1] N — пороговый уровень данных антител в нормальной сыворотке (Karsh et al., 1982).

Таблица 13-3. Определение гетерофильных антител классов IgM и IgG при инфекционном мононуклеозе[1)]

Анализируемый препарат	Номер образца	Оптическая плотность при использовании		Отношение значений оптической плотности IgG/IgM, %
		конъюгата, специфичного к IgG	конъюгата, специфичного к IgM	
Инфекционный мононуклеоз	1	0,145	1,740	8,3
	2	0,050	0,430	11,6
	3	1,025	0,935	2,7
	4	0,045	0,885	5,1
	5	0,055	1,685	3,3
	6	0,090	0,705	13,0
	7	0,230	0,690	33,3
	8	0,270	1,305	20,7
	9	0,285	0,650	43,8
	10	0,550	1,890	29,1
Норма	1	0,02	0,01	
	2	0,02	0,02	
	3	0,02	0,03	
Контрольные диски с иммобилизованным IgG		1,435	0,000	
Контрольные диски с иммобилизованным IgM		0,005	1,655	

[1)] По Halbert et al., 1982.

антител обоих классов с преобладанием IgM, в то время как у больного 5 значительно преобладают антитела против ДНК и ДНП класса IgG. Для больного 3 наблюдается повышенный уровень антител против ДНП, главным образом это IgG, а для больного 4 среди антител против ДНП заметно преобладает IgM. У больных 5, 7 и 8 имеется высокий уровень антител и против ДНК, и против ДНП в основном класса IgG, в случае же больного 6 наблюдается чрезвычайно высокий уровень антител обоих классов и обоих типов антигенной специфичности.

В случае инфекционного мононуклеоза основную массу гетерофильных антител составляют IgM, поэтому для диагностики этого заболевания с помощью ELISA использовали меченные ферментом антитела, специфичные к тяжелым цепям IgM, и диски, покрытые слоем антигена, выделенного из стромы бычьих эритроцитов. Однако параллельные тесты, проводившиеся с применением конъюгата, специфичного к тяжелым цепям IgG, показали, что для больных инфекционным мононуклеозом характерно присутствие в сыворотке также небольших количеств гетерофильных антител класса IgG (см. табл. 13-3). Следует отметить, что относительное содержание специфических IgG по сравнению с IgM варьирует в диапазоне от 2,7 до 43,8 %. Для нормальной сыворотки наблюдается лишь незначительный уровень фоновой активности. С помощью контрольных реакций с дисками, покрытыми IgM или IgG, показано, что использованные конъюгаты характеризовались практически 100%-ной класс-специфичностью.

Для определения ревматоидного фактора в роли иммобилизованного на дисках «антигена» выступает IgG человека. Поскольку основным компонентом в этом случае является IgM, в тест-систему был включен ферментный конъюгат антител, специфичных к IgM. Во избежание взаимодействия с иммобилизованным IgG этот конъюгат должен обладать специфичностью только к тяжелым цепям IgM. Для тестирования тиреоглобулиновых антител использовали антитела против легких цепей IgG. Тиреоглобулин-специфический иммунный ответ определяется главным образом этим классом иммуноглобулинов (Torrigiani et al., 1968). Однако в нем участвуют и другие классы Ig, которые также будут регистрироваться за счет специфичности реагента к легким цепям.

При попытке разработать систему тестирования IgM в препаратах антител против вируса краснухи исследователи столкнулись с серьезными затруднениями. В таком тесте с использованием иммобилизованного вируса и ферментного конъюгата, специфичного к тяжелым цепям IgM, для препаратов сыворотки от больных в стадии выздоровления (после надежно установленного заболевания краснухой) удавалось получать вполне удовлетворительные результаты. Повышению эффективности анализа способствовало удаление из препаратов большей части IgG с помощью обработки белок А-содержащими клетками *Staphylococcus aureus*. Однако при таком тестировании псевдоположительную реакцию давали многие препараты нормальной сыворотки. При этом фракции IgM, содержащихся в таких препаратах, оказывались неактивными в анализах, основанных на ингибировании вирусной гемагглютинации. Интересно, что наблюдавшуюся псевдоположительную реакцию на IgM, специфичную к краснухе, удавалось надежно заблокировать предварительной обработкой очищенным вирусным антигеном. В то же время обработка большими дозами контрольных клеточных экстрактов, полученных на нормальных неинфицированных тканях, абсолютно не влияла на результаты тестирования. Можно отметить также, что большое количество псевдоположительных реакций на специфичные к краснухе IgM было зарегистрировано для серии препаратов сыворотки пациентов с подтвержденным инфекционным мононуклеозом (Morgan-Capner et al., 1983).

Специфичность реакций в методе ELISA

Помимо корреляции, наблюдаемой при сопоставлении результатов анализа в тест-системах на базе метода ELISA и результатов, полученных с применением альтернативных методов анализа, специфичность реакций в методе ELISA можно продемонстрировать с помощью классических иммунологических приемов — блокирования или адсорбции. Предварительная инкубация данной сыворотки с различными антигенами приводила к существенному блокированию ее активности в анализе методом ELISA только при использовании антигена, специфичного для тестируемых антител. Это продемонстрировано на рис. 13-3 для случая тестирования тиреоглобулиновых антител. Блокирование последующих реакций даже при высоком титре антител наблюдалось только при обработке препаратов антисыворотки тиреоглобулином, тогда как обработка ДНК, ДНП, агрегированным тепловой обработкой IgG и концентрированным препаратом вируса гриппа не приводила к каким-либо видимым изменениям.

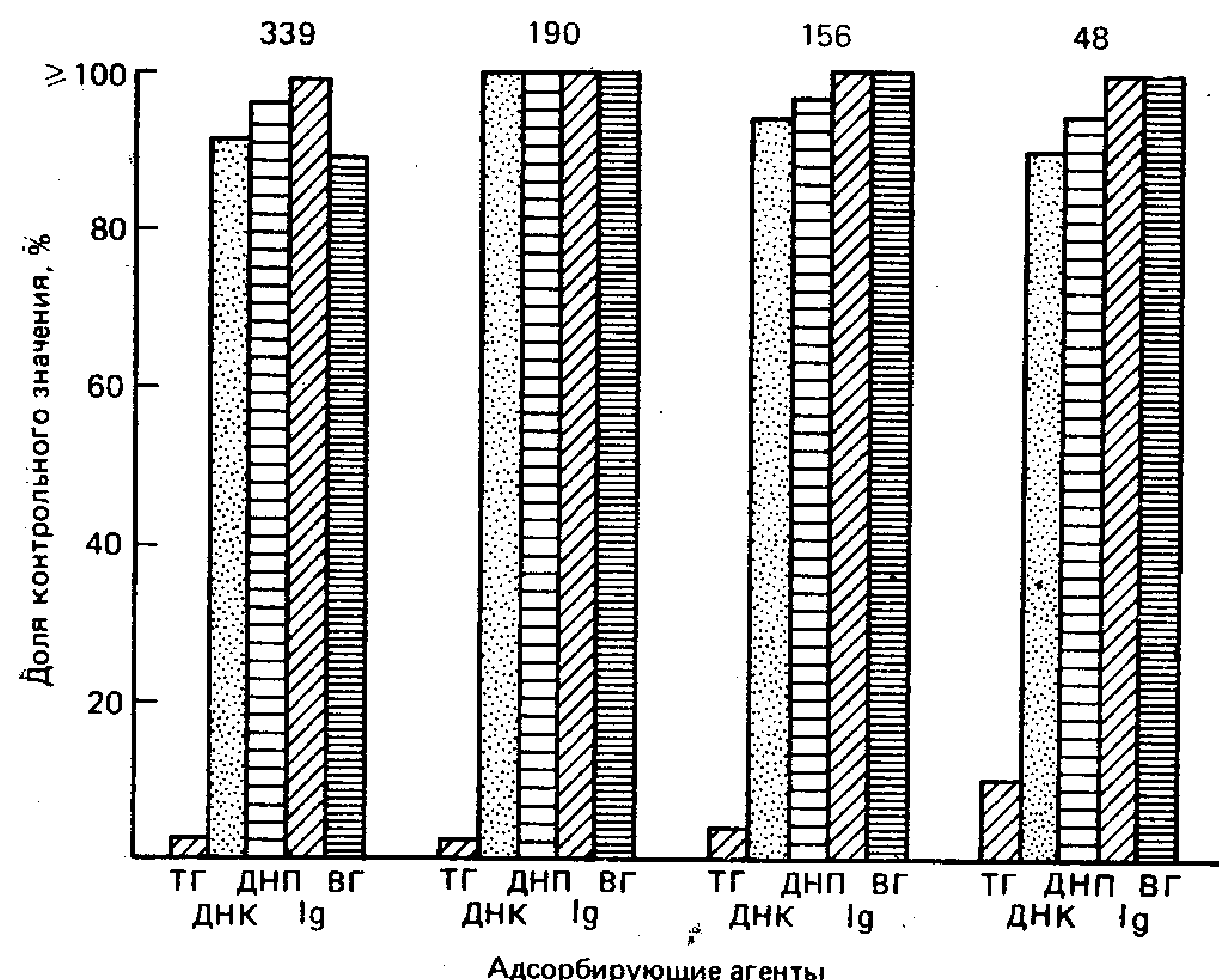


Рис. 13-3. Адсорбционные эксперименты, подтверждающие специфичность метода ELISA при определении тиреоглобулиновых аутоантител. Цифры наверху отражают значения, полученные в контрольном определении методом ELISA без предварительной адсорбции для четырех представленных образцов патологической сыворотки (при норме <15). Использованы следующие адсорбирующие агенты: ТГ — очищенные тиреоглобулины человека, ДНК — ДНК из тимуса теленка, ДНП — ДНП из тимуса теленка, Ig — IgG человека, агрегированные нагреванием, ВГ — частично очищенный вирус гриппа, тип A (Halbert et al., 1983).

Таблица 13-4. Постановка опытов, в которых изучали блокирование препаратами сыворотки больных инфекционным мононуклеозом, положительными по данным тест-системы CORDIA IM, но отрицательными по агглютинации лошадиных эритроцитов

Тестируемый образец	Значение в анализе CORDIA IM после обработки[1]			
	контрольное разведение	гетерофильным IM-антигеном	стромой бычьих эритроцитов	агрегированными IgG человека
1	47	10	4	45
2	38	7	9	33
3	21	4	2	22
4	52	22	5	55
5	20	8	7	23
6	23	7	8	27
7	26	10	7	32
8	21	2	3	21
9	31	2	3	23

[1]) В тест-системе CORDIA IM положительным является значение ≥20 (Halbert et al., 1982).

Такой подход к проверке достоверности анализа особенно полезен для тех препаратов, которые оказываются положительными по данным ELISA, но отрицательными по данным альтернативного контрольного метода. Это можно проиллюстрировать на примерах тестирования препаратов сыворотки больных инфекционным мононуклеозом, приведенных в табл. 13-4. Диагноз был основан на обнаружении у больных IgM против капсидного антигена вируса Эпштейна — Барра. В то же время эти препараты сыворотки давали отрицательную реакцию в анализе, основанном на агглютинации лошадиных эритроцитов. Можно видеть, что очищенный гетерофильный IM-антиген и строма из бычьих эритроцитов эффективно блокируют последующие реакции в тест-системе CORDIA IM, в то время как агрегированные нагреванием IgG человека на них абсолютно не влияют. Последние, конечно, как уже упоминалось, весьма эффективно блокируют реакции в системе тестирования ревматоидных IgM.

Тесты с блокированием оказались также весьма полезны для подтверждения достоверности результатов, полученных для некоторых слабо реагирующих препаратов сыворотки, в системе ELISA для антител к вирусу краснухи, которые к тому же давали отрицательную реакцию в тесте по ингибированию гемагглютинации. Некоторые из подобных тестов отражены на рис. 13-4, на котором можно видеть, что реакции в системе ELISA надежно блокируются в случае преинкубации с очищенным антигеном вируса краснухи, но не претерпевают никаких изменений в результате инкубации с клеточными экстрактами

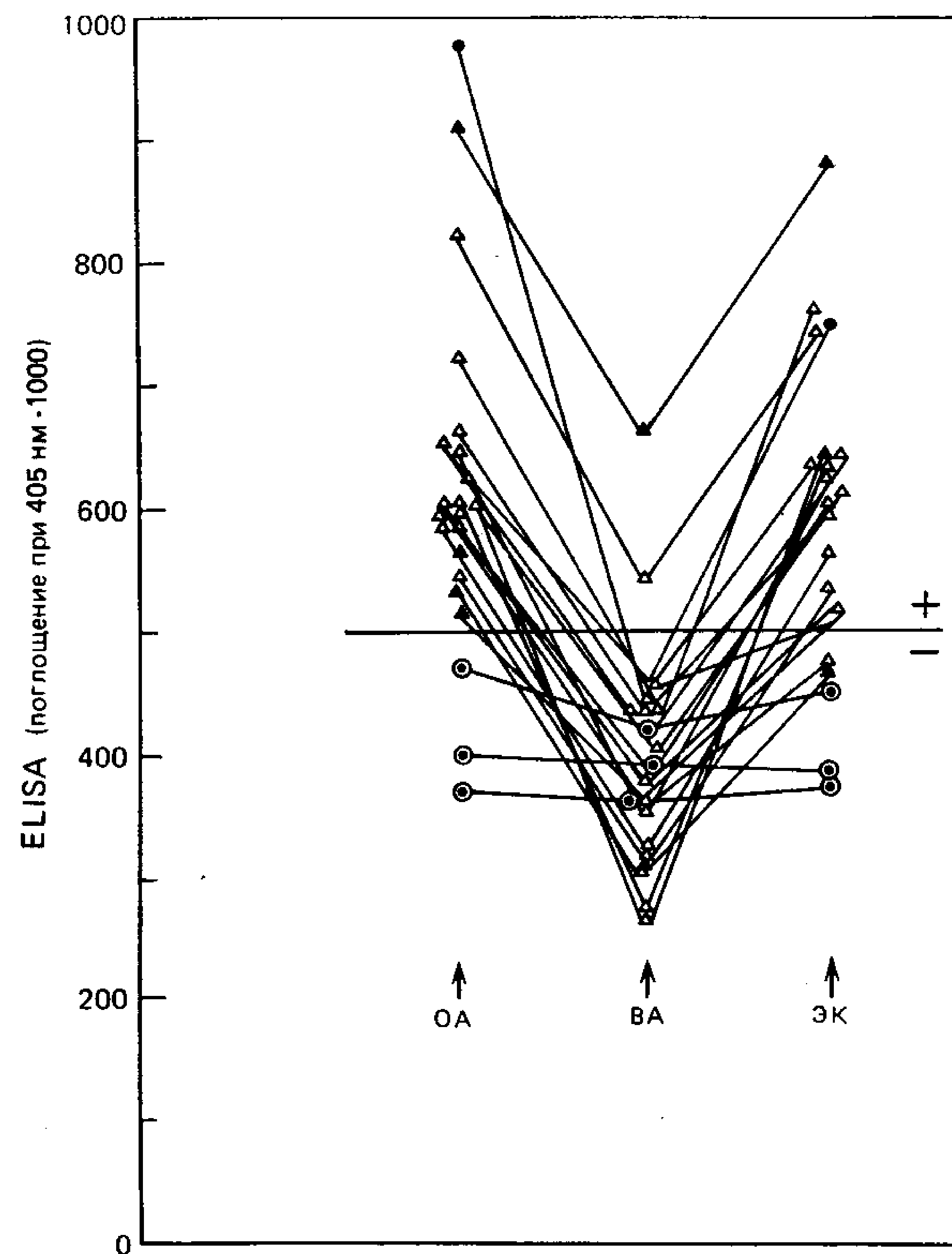


Рис. 13-4. Блокирование антител к вирусу краснухи в образцах сыворотки: темные кружки — положительных по ELISA и ингибированию гемагглютинации (ИГА); светлые треугольники — положительных по ELISA и отрицательных по ИГА (частичное ингибирование); темные треугольники — положительных по ELISA и отрицательных по ИГА; светлые кружки с темным центром — отрицательных по ELISA и ИГА. Перед тестированием с помощью метода ELISA образцы инкубировали в присутствии вирусного антигена (ВА), экстракта неинфицированной культуры клеток BHK-21 (ЭК) или в отсутствие антигена (ОА) (Kleeman et al., 1983).

неинфицированных тканей (Kleeman et al., 1983). Еще более убедительно выглядит неспособность к блокированию, обнаруживаемая у аналогичных экстрактов инфицированных тканей, после удаления вируса ультрацентрифугированием. Эти данные подтверждают уже высказывавшиеся ранее предположения о том, что метод ELISA позволяет обнаруживать антитела против вируса краснухи в очень низких концентрациях, лежащих за пределами чувствительности гемагглютинационных тестов (Kleeman et al., 1983; Serdula et al., 1984).

Диагностическое значение обнаружения антител методом ELISA

Назначение тестов на антитела с помощью метода ELISA заключается в том, чтобы помочь врачу надежно установить диагноз больного или проследить за ходом заболевания для больных с уже установленным диагнозом. Для некоторых рассмотренных выше тест-систем была продемонстрирована хорошая корреляция между результатами анализа и клиническим диагнозом или характером развития заболевания. Одним из показательных примеров является исследование возможностей применения теста CORDIA A для диагностики острой инфекции *Entamoeba histolytica* (Healy, Walker, 1982). Из 55 больных с установленным амебным абсцессом печени для 52 (95%) была зафиксирована положительная реакция в тесте CORDIA A. Из 57 больных, страдающих острой формой амебной дизентерии, 55 (96 %) давали положительную реакцию при тестировании методом CORDIA A. Вместе с тем при отсутствии симптомов инфекции положительную реакцию при тестировании методом CORDIA A давал лишь 1 из 25 (4 %) больных, для которых было характерно присутствие в образцах кала *E. histolytica*. В контрольной группе из 83 больных с иными типами заболеваний был обнаружен лишь 1 (1 %) человек с положительной реакцией в системе CORDIA A. Большинство больных последней группы характеризовались различными желудочно-кишечными заболеваниями и заболеваниями печени, а единственный человек с положительной реакцией при ИФА являлся носителем этиологически неохарактеризованного печеночного поликистита. Аналогичные результаты были получены и при широкомасштабном изучении возможностей применения теста CORDIA A для диагностики амебных абсцессов в полевых условиях в Юго-Восточной Азии (Cross J. H., личное сообщение, 1982).

При использовании тест-системы CORDIA N (Estes D., личное сообщение, 1983) было установлено, что при обследовании 56 больных острой системной красной волчанкой в 91 % случаев обнаруживается присутствие антител против ДНК, причем часто на весьма высоком уровне. В то же время среди больных на стадии ремиссии (неострая форма) присутствие антител, как правило, на крайне низком уровне было зарегистрировано лишь для 10 (32 %) из 31 человека. Среди больных контрольной группы с иными заболеваниями соединительных тканей, включая смешанные заболевания, прогрессирующий системный склероз, синдром Съёргена, положительная реакция, во всех случаях на аномально низком уровне, зарегистрирована только для 7 (14 %) из 50 человек. По данным ранних, более обширных обследований лишь у одного (3%) из 35 здоровых человек

Таблица 13-5. Тесты CORDIA N и CORDIA NP при анализе препаратов сыворотки больных системной красной волчанкой в стадии ремиссии и обострения заболевания

Больной	Интервалы между отбором образцов, дни	Метод Фарра, (% связывания) N<25[1])	CORDIAN, МЕ/мл		CORDIANP, МЕ/мл	
			IgG N<89	IgM N<163	IgG N<24	IgM N<28
1	120	15	167	48	112	10
		90	2 831	198	827	373
2	360	40	242	94	157	23
		97	3 541	658	1 529	203
3	240	22	1 462	132	41	199
		96	1 812	1 814	972	1 135
4	300	95	1 394	1 294	972	584
		64	1 900	341	743	130

[1]) N< — значение в норме меньше приведенных пороговых величин (Karsh et al., 1982).

была обнаружена слабая положительная реакция (Halbert et al., 1981; Karsh et al., 1982).

При обследовании больных с подтвержденной системной волчанкой было установлено, что наблюдаемые изменения значений в тестах CORDIA N и CORDIA NP коррелируют с результатами метода Фарра в ходе ремиссии или обострения заболевания (Karsh et al., 1982). Примеры приведены в табл. 13-5 с дополнительными данными относительно распределения специфических антител по классам иммуноглобулинов. Во время обострения заболевания у больных 1 и 2 наблюдалось резкое возрастание содержания антител к нуклеопротеиновым антигенам обоих типов преимущественно за счет наработки IgG. Для больного 3 обострение болезни было связано с резким ростом содержания IgM, специфичных как к ДНК, так и к ДНП, в то время как содержание IgG, специфичных к ДНК, оставалось практически на неизменно высоком уровне. В ходе частичной ремиссии у больного 4 снижение общего содержания антител против ДНК и ДНП происходило главным образом за счет класса IgM.

При диагностировании краснухи с помощью совместного анализа пáрных препаратов сыворотки, соответствующих острому состоянию и этапу выздоровления, использование метода CORDIA R позволяло зафиксировать рост значений сигнала (МЕ/мл) в 3 и более раз для 83 из 84 проанализированных пар. Методом ингибирования гемагглютинации диагноз был поставлен в 82 случаях из 84, для чего было необходимо зафиксировать не менее чем 4-кратное повышение наблюдаемого значения титра вируса.

В заключение следует отметить, что принцип ELISA дает хорошую основу развитию клинически важных диагностических тестов для определения специфических антител. Достоверные количественные данные с необходимой избирательностью ответа могут быть быстро и легко получены при анализе единичного разведения сыворотки.

Литература

Chessum B. S., Denmark J. R., 1978. Inconstant ELISA, Lancet, Jan., 161.
Engvall E., Perlmann P. (1972). Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-linked antiimmunoglobulin in antigen-coated tubes, J. Immunol., **109**, 129—135.
Halbert S. P., Karsh J., Anken M. (1980). A quantitative enzyme immunoassay for IgM rheumatoid factor using human immunoglobulin G as substrate, Am. J. Clin. Path., **74**, 776—784.
Halbert S. P., Karsh J., Anken M. (1981). Studies on autoantibodies to deoxyribonucleic acid and deoxyribonucleoprotein with enzyme-immunoassay (ELISA), J. Lab. Clin. Med., **97**, 97—111.
Halbert S. P., Anken M., Henle W., Golubjatnokov R. (1982). Detection of infectious mononucleosis heterophil antibody by a rapid, standartized enzyme-linked immunosorbent assay procedure, J. Clin. Microbiol., **15**, 610—616.
Halbert S. P., Bastomsky C. H., Anken M. (1983). A rapid standartized enzyme immunoassay for autoantibodies to thyroglobulin, Clin. Chim. Acta, **127**, 69.
Healy G. R., Walker J. M., 1982. Analysis of the sensitivity and specificity of the CORDIA A ELISA test for the diagnosis of amebiasis. 31st Annual Meeting of Am. Soc. Trop. Med. Hyg. Poster, 86.
Janeway C. A., Rosen F. S., Merler E., Alper C. A., 1967. The Gamma Globulins, Little, Brown and Company, Boston, 148 pp.
Karsh J., Halbert S. P., Anken M., Klima E., Steinberg A. D. (1982). Anti-DNA anti-deoxyribonucleoprotein and rheumatoid factor measured by ELISA in patients with systemic lupus erythematosus, Sjogren's syndrome and rheumatoid arthritis, Int. Arch. Allergy Appl. Immun., **68**, 60—69.
Kiefer D. J., Phelps D. A., Halbert S. P. (1983). Normalized enzyme-linked immunosorbent assay for determining immunoglobulin G antibodies to cytomegalovirus, J. Clin. Microbiol., **18**, 33—39.
Kleeman K. T., Kiefer D. J., Halbert S. P. (1983). Rubella antibodies detected by several commercial immunoassays in hemagglutination inhibition-negative sera, J. Clin. Microbiol., **18**, 1131—1137.
Lin T. M., Halbert S. P., O'Connor G. R. (1980). Standartized quantitative enzyme-linked immunoassay for antibodies to *Toxoplasma gongii*, J. Clin. Microbiol., **11**, 675—681.
Lin T. M., Halbert S. P., Chiu C. T., Zarco R. (1981). Simple standardized enzyme-linked immunosorbent assay for human antibodies to *Entamoeba histolytica*, J. Clin. Microbiol., **13**, 646—651.
Lin T. M., Halbert S. P., Cort R., Blaschke M. J. (1983). An enzyme-linked immunoassay for circulating immune complexes using solid-phased goat Clq., J. Immunol. Methods, **63**, 187—205.
Morgan-Capner P., Tedder R. S., Mace J. E. (1983). Rubella-specific IgM reactivity in sera of infectious mononucleosis, J. Hyg. Camb., **90**. 407—413.
Serdula M. K., Halstead S. B., Wiebenga N. H., Herrmann K. L. (1984). Serological response to rubella vaccination, J. Am. Med. Assoc., **251**, 1974—1977.
Torrigiani G., Roitt I. M., Doniach D. (1961). Quantitative distribution of thyroglobulin autoantibodies, Clin. Exp. Immunol., **3**, 621—630.
Weisburger E. K., Russfield A. B., Homburger F., Weisburger J. H., Boger E., van Dongen C. G., Chu K. C. (1978). Testing of twenty-one environmental aromatic amines or derivatives for long-term toxicity or carcinogenicity, J. Environmental Path. Toxicol., **2**, 325—356.

Глава 14

Амплифицированный фермент-зависимый иммуносорбционный анализ (a-ELISA)

Дж. Е. Батлер[1], Дж. Х. Петерман, Т. Е. Кёртдж

I. Введение

Постоянный интерес к проблемам иммунорегуляции и к изучению иммунного ответа против патогенов и других веществ, вызывающих болезни человека и животных, значительно стимулировал процесс разработки методов, позволяющих точно и воспроизводимо определять специфические антитела в крови и других физиологических жидкостях. Особенно важной представляется возможность изучения иммунного ответа в соответствии с изотипом вырабатываемых антител. Для решения такого рода задач весьма перспективным является использование принципа высокочувствительного и безопасного в работе метода (ELISA) (от англ. Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Avrameas, Gilbert, 1972; Engvall et al., 1971). Так называемый амплифицированный вариант ELISA (a-ELISA) является модификацией метода, при которой сочетаются принципы непрямого детектирования и использование систем регистрации нековалентных комплексов антиген — антитело (Butler et al., 1978b). Последний подход позволяет избежать нежелательных модификаций как фермента, так и антител; при его использовании можно проводить ферментативную индикаторную реакцию с субстратом после полной диссоциации комплекса. В результате удается создать систему, которая характеризуется повышенной чувствительностью и значительной гибкостью в применении к решению различных задач. Метод a-ELISA успешно используется для изучения изотипического распределения при выработке специфического иммунного ответа в самых различных организмах.

Этот метод можно приспособить также для определения характера распределения антигенов в ходе биохимического фракционирования. Такой вариант ELISA получил название «анализ распределения антигенов». И наконец, система a-ELISA может быть использована в непрямом конкурентном иммунологическом анализе для количественного определения малых количеств антигена.

Вариант a-ELISA был разработан нами в ходе решения проблем, возникших при попытках использования традиционного метода для количественной регистрации антител определенного субизотипа (Sloan, 1975). В первую очередь мы стремились избежать необходимости аффинной очистки антиглобулинов, содержащихся в достаточно слабой субизотип-специфической сыворотке, для изготовления эффективных субкласс-специфических конъюгатов антител с ферментом. Во-вторых, была поставлена цель — преодолеть потери как ферментативной, так и иммунологической активностей и продлить сроки службы конъюгатов, получаемых с использованием глутарового альдегида. Мы разработали непрямой антиген-специфический метод анализа, основанный на применении растворимого иммунокомплекса [фермент — антитело], связывающегося с предварительно введенными в реакцию субкласс-специфическими антиглобулинами через так называемый мостик, образуемый молекулами другого (мостикового) антиглобулина. Последовательность реакций, используемая в методе a-ELISA, приведена на рис. 14-1 в сопоставлении с некоторыми другими вариантами проведения антиген-специфического ИФА.

Метод a-ELISA использовали в качестве модели для изучения стехиометрии в твердофазных методах определения антител. При проведении этих исследований были получены данные, на основании которых может быть сделан оптимальный выбор схемы

[1] Исследования в области a-ELISA в последнее время обеспечивались грантами 83-CRSR-2-2172 (USDA), HL 22676 (NIH) и 5T32DE 07007 (NIH).

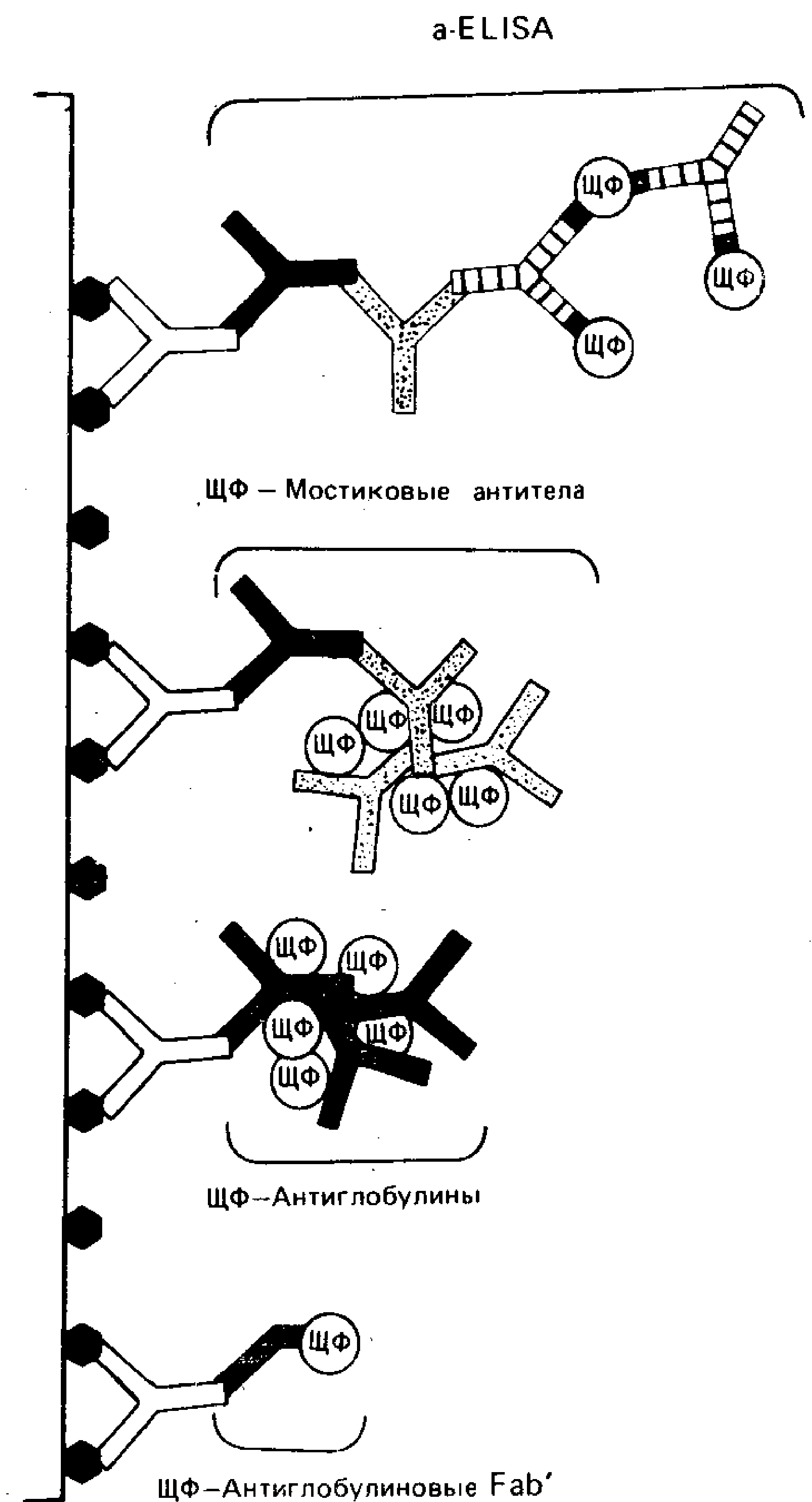


Рис. 14-1. Сопоставление последовательности реакций в методе a-ELISA и в других антиген-специфических вариантах ELISA. ЩФ — щелочная фосфатаза; темный шестиугольник — иммобилизованный антиген; светлые Y-образные молекулы — первые антитела; темные Y-образные молекулы — изотип-специфические антиглобулины; Y-образные молекулы, помеченные точками — третьи антитела, в одном из вариантов конъюгированные с фосфатазой; заштрихованные Y-образные молекулы — антитела против ЩФ. В двух вариантах (*в середине схемы*) используются обычные конъюгаты, полученные в одну стадию с помощью глутарового альдегида.

ELISA в применении к решению конкретной задачи. Нами были исследованы особенности взаимодействия белков с пластиковой подложкой, влияние аффинности и валентности антител на эффективность детектирования и, что наиболее существенно, зависимость между связыванием антител с иммобилизованным антигеном и эффективностью их непрямой регистрации с помощью a-ELISA. Для нас было также важно получить возможность измерять абсолютные количества антител и проводить непосредственное накопление и обработку текущих данных с помощью персонального компьютера. В настоящей главе будут обобщены результаты наших исследований в названных направлениях.

II. Приготовление реагентов

А. Источник антиглобулинов

1. Получение специфических антиглобулинов. В нашей лаборатории поликлональные кроличьи антиглобулины, специфичные к IgA, IgG и IgM крыс, мышей и человека, получали с использованием в качестве иммуногенов как очищенных нормальных, так и миеломных иммуноглобулинов (или их Fc-фрагментов). Антитела, специфичные к бычьим IgG1, IgG2, SIgA и IgM и к свиным IgG, IgA и IgM (а также к кроличьим), получали с использованием в качестве иммуногенов очищенных поликлональных иммуноглобулинов соответствующих типов. Козьи антитела и антитела морской свинки, специфичные к кроличьим IgG и IgA, были получены с использованием нормальных IgG (или Fc-фрагментов) и SIgA, выделенных из сыворотки и молока соответственно.

Фракции антител, специфичных к тяжелым цепям соответствующих иммуноглобулинов, получали, исходя из антисыворотки кролика или морской свинки, аффинной хроматографией на колонках, содержащих иммобилизованные подходящие Ig, индивидуальные или в смеси с другими белками (табл. 14-1). До проведения хроматографической очистки все антисыворотки анализировали с помощью иммунодиффузии. Для каждой антисыворотки подбирали подходящую колонку, проводя предварительные адсорбционные тесты с использованием соответствующих антигенов.

Козьи мостиковые антиглобулины, используемые в сочетании с кроличьими антителами, специфичными к тяжелым цепям, и кроличьими антителами против щелочной фосфатазы, подвергали очистке только в случае возникновения проблемы так называемого «короткого замыкания» (см. разд. II.В.1). Мостиковые антитела для использования в сочетании с антиглобулинами морской свинки получали иммунизацией кроликов препаратами IgG морской свинки.

Таблица 14-1. Иммуносорбенты, использованные для получения изотип-специфичных антиглобулинов

Антиглобулины[1])	Аффинные лиганды, иммобилизованные на колонках[2])
IgG (мышь, крыса, свинья, человек, морская свинка)	$F(ab')_2$-фрагменты IgG тех же организмов
IgA (мышь, крыса, свинья, человек, морская свинка)	IgG; IgM-α_2-макроглобулиновая фракция нормальной сыворотки
IgM (мышь, крыса, человек)	IgG; миеломные IgA, α_2-макроглобулины
IgM (свинья, крупный рогатый скот)	IgG/IgA-фракция молозива и зародышевой сыворотки (источник α_2-макроглобулинов)
IgG1 (крупный рогатый скот)	IgG2
IgG2 (крупный рогатый скот)	IgG1

[1]) Названия животных, приведенные в скобках, означают источники соответствующих антиглобулинов.

[2]) Аффинные колонки получены с использованием метода активации сефарозы 4B бромцианом (Axen, Vretblad, 1971), как описано в работе (Cuatrecasas, Anfinsen, 1971). Содержание антигена составляло как правило 5—10 мг/мл геля. Обычно 2 мл геля достаточно для адсорбции 0,5 мл сыворотки при двукратном нанесении.

2. Коммерческие препараты. По нашим наблюдениям все коммерческие препараты (за исключением мостиковых антител, от которых не требуется проявления высокой изотипической специфичности) характеризуются: а) недостаточно высокой специфичностью и б) чрезвычайно низким содержанием антител, т. е. недостаточно высоким титром. Поэтому мы предпочитаем получать необходимые препараты самостоятельно.

Б. Получение растворимого иммуноферментного комплекса (ИФК)

1. Щелочная фосфатаза и антитела к ней. Щелочную фосфатазу (ЩФ) производства фирмы Sigma получали либо в форме суспензии в сульфате аммония (из слизистой кишечника быка, тип VII-5, P5521), либо в виде раствора, содержащего NaCl (P6774). Антитела к ЩФ (анти-ЩФ) получали иммунизацией кроликов или морских свинок 1 мг ЩФ, эмульгированной в полном адъюванте Фрейнда. Инъекции осуществляли: для кроликов — в подушечки на лапках, для морских свинок — подкожно. Повторные инъекции делали внутривенно (кроликам) или внутрикожно (морским свинкам).

Содержание анти-ЩФ оценивали по преципитации при иммунодиффузии. Антисыворотки, обладающие сходными иммунологическими свойствами, объединяли. Для установления соотношений эквивалентности проводили турбидиметрическую пре-

ципитацию с последующим анализом супернатанта методом иммунодиффузии.

2. Получение и характеристика ИФК. Преципитат ИФК получали инкубацией 1,0 мл антисыворотки кролика или морской свинки с серологически эквивалентным количеством ЩФ (типа P5521 или P6674) 1 ч при 37 °С и затем в течение ночи при 4 °С. После центрифугирования осадок промывали дважды фосфатно-солевым буфером (ФСБ) или боратно-солевым буфе-

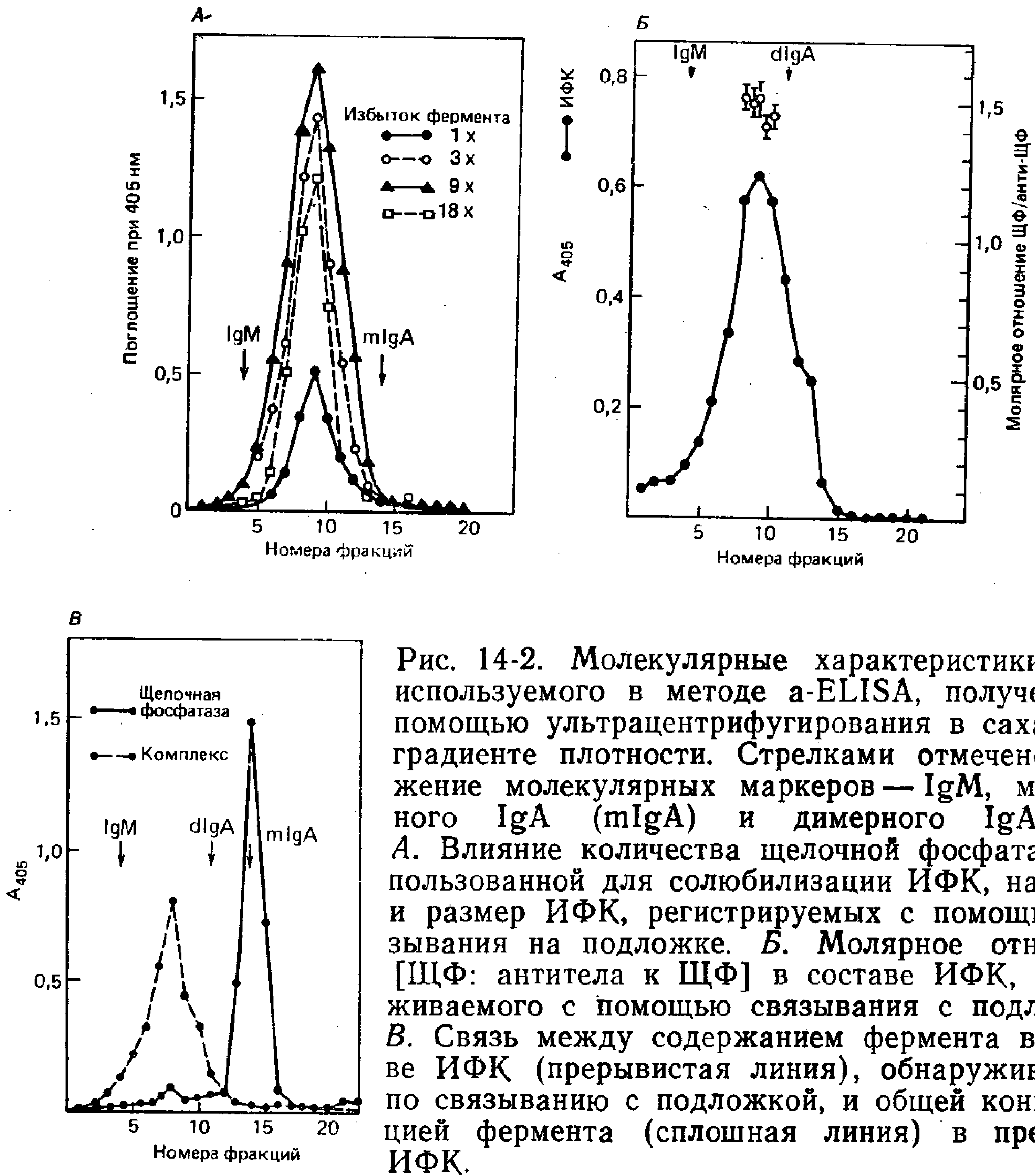


Рис. 14-2. Молекулярные характеристики ИФК, используемого в методе a-ELISA, полученные с помощью ультрацентрифугирования в сахарозном градиенте плотности. Стрелками отмечено положение молекулярных маркеров — IgM, мономерного IgA (mIgA) и димерного IgA(dIgA). *А.* Влияние количества щелочной фосфатазы, использованной для солюбилизации ИФК, на выход и размер ИФК, регистрируемых с помощью связывания на подложке. *Б.* Молярное отношение [ЩФ: антитела к ЩФ] в составе ИФК, обнаруживаемого с помощью связывания с подложкой. *В.* Связь между содержанием фермента в составе ИФК (прерывистая линия), обнаруживаемого по связыванию с подложкой, и общей концентрацией фермента (сплошная линия) в препарате ИФК.

ром (БСБ), а затем ресуспендировали в 5 мл ФСБ, содержащего 9-кратный (в весовом отношении) избыток ЩФ. Суспензию перемешивали в течение ночи при 4 °С и перед распределением на аликвоты определяли ее активность (разд. III.В.3). Аликвоты можно хранить при —20 °С без дополнительной обработки или добавив NaN_3 до 0,02% и равный объем глицерола (разд. III.Б.3).

Таблица 14-2. Относительная активность иммуноферментных комплексов после хранения в различных условиях в течение пяти лет

Обработка ИФК и температура хранения	Разведение, соответствующее A_{405}=0,5	Относительная активность[1])
ФСБ, 4 °С	1330	0,31
0,1%-ный твин-20, 4 °С	—[2])	—
20%-ная сахароза, 4 °С	—	—
50%-ный глицерол, 4 °С	1900	0,44
0,1%-ный твин-20, —20 °С	1050	0,24
20%-ная сахароза, —20 °С	2500	0,58
50%-ный глицерол, —20 °С	2300	0,54
Свежеприготовленный ИФК в 50%-ном глицероле	4300	1,00

[1]) Относительная активность = $\frac{\text{Разведение ИФК после хранения, соответствующее } A_{405}=0{,}5}{\text{Разведение свежеприготовленного ИФК, соответствующее } A_{405}=0{,}5}$

[2]) За соответствующее время при анализе не удалось достичь значения A_{405}=0,5.

На рис. 14-2, *А* показан седиментационный профиль препаратов активного ИФК, солюбилизированного в присутствии различных избыточных количеств ЩФ. Результаты седиментационного анализа показывают, что количество избыточной ЩФ не сказывается на значении молекулярной массы функционального ИФК, но заметно влияет на выход солюбилизированного ИФК. Оптимальные условия соответствуют 9-кратному избытку ЩФ.

На рис. 14-2, *Б* показаны результаты изучения молекулярного состава ИФК с использованием ^{131}I-ЩФ и ^{125}I-анти-ЩФ, как описано в работе Кертджа и др. (Koertge et al., 1985). Молярное отношение антиген : антитело в активном ИФК составляет 1,5 : 1. В сочетании с оцениваемым по данным седиментации эквивалентным значением молекулярной массы комплекса (~650 000) это позволяет предположить, что ИФК состоит из трех молекул ЩФ и двух молекул анти-ЩФ (см. рис. 14-1).

На рис. 14-2, *В* проиллюстрирован еще один способ характеристики ИФК. В реальной системе тестирования с использованием ИФК присутствует большой избыток свободной ЩФ. Предварительные попытки извлечь из этой смеси и вновь использовать избыточный фермент сопровождались изменениями молекулярного состава ИФК, в связи с чем от них пришлось отказаться.

3. Хранение ИФК. При относительно непродолжительном хранении в ФСБ при 4 °С, —20 °С или —70 °С (в течение года) не было замечено существенных изменений функциональной активности ИФК (Butler, 1981). Изучали также влияние различных условий длительного хранения (в течение 5 лет) на

функциональную активность (табл. 14-2) и молекулярный размер ИФК (Koertge et al., 1985). Полученные данные свидетельствуют о том, что наибольшую стабильность проявляют препараты ИФК в 50%-ном глицероле при —20 °C. При этом все препараты при —20 °C в значительной степени сохраняют функциональную активность, но претерпевают небольшие изменения в молекулярном составе ИФК. Среди препаратов, хранящихся длительное время при 4 °C, существенную функциональную активность, несмотря на небольшие структурные изменения, сохраняет лишь ИФК в 50%-ном глицероле (Koertge et al., 1985). На основании этих данных мы рекомендуем следующие условия хранения препаратов ИФК: в 50%-ном глицероле при —20 °C для длительного хранения и в ФСБ или БСБ при —20 °C для хранения сроком до года. Несмотря на то что при непродолжительном хранении при 4 °C препараты ИФК также довольно стабильны (Butler, 1981), мы предпочитаем хранить их при —20 °C во избежание бактериального роста.

В. Проверка специфичности

1. «Короткие замыкания» в цепи последовательных реакций. Для вариантов метода ELISA, основанных на использовании нескольких антител, вероятность возникновения так называемых «коротких замыканий» существенно выше, чем для вариантов анализа, включающих меньшее количество последовательных реакций. Возможные разновидности такого рода «замыканий» схематически показаны на рис. 14-3.

Весьма часто приходится сталкиваться с таким типом «замыкания», при котором первичные антитела «узнают» носитель в составе комплекса [гаптен — носитель] (тип А). Нам удается преодолеть эту проблему благодаря использованию альбумина, выделенного из организма — донора первичных антител, в качестве носителя для гаптена. При этом ни в одном из препаратов мы ни разу не обнаружили присутствия антител к гомологичному альбумину. Для решения проблем, связанных с «замыканием» типа [антиген — изотип-специфический антиглобулин] (тип Б) или [антиген — мостиковые антитела] (тип В), необходимо проводить адсорбционную очистку антиглобулинов. Часто приходится сталкиваться с побочным узнаванием человеческого IgG мостиковыми козьими антителами против кроличьих иммуноглобулинов. Для предотвращения взаимодействий такого типа необходимо провести аффинную очистку мостиковых антител на колонке с иммобилизованным человеческим IgG.

Проблему «коротких замыканий» между мостиковыми и первичными антителами (тип Г) можно разрешить, пользуясь тем же подходом, который был использован для устранения побочных взаимодействий с носителем. Для этого мостиковые

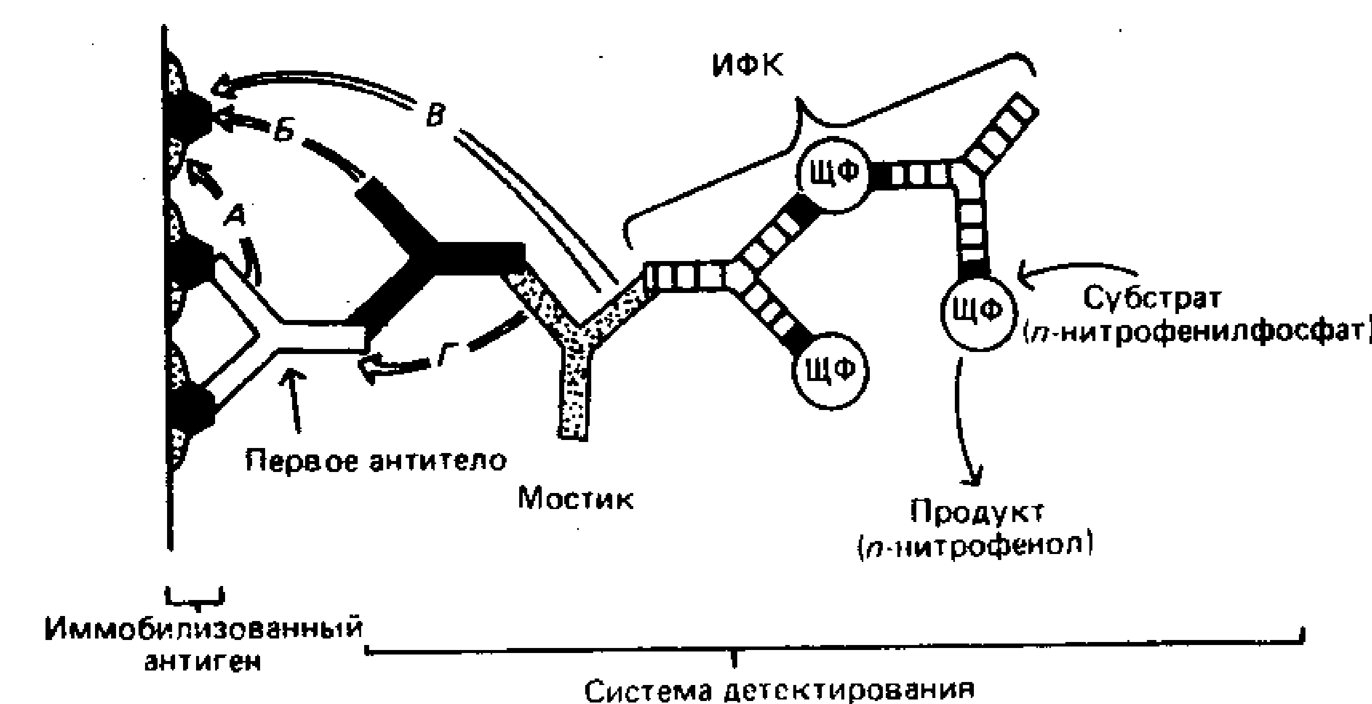


Рис. 14-3. Схема проведения анализа методом a-ELISA, иллюстрирующая возможные «короткие замыкания». Темные шестиугольники в окружении секторов, отмеченных точками, обозначают молекулы гаптена на носителе. Стрелками показаны четыре возможных типа (*А—Г*) «коротких замыканий», рассмотренных в тексте.

антитела следует получать от того же вида, что и первичные. Мы сделали это в варианте a-ELISA для кроличьих антител. В систему были включены изотип-специфические антиглобулины и антитела к щелочной фосфатазе морской свинки и кроличьи мостиковые антитела против иммуноглобулинов морской свинки.

Что касается преодоления проблем «коротких замыканий» то здесь метод a-ELISA имеет два основных преимущества: 1) сам ИФК обладает иммунологическим сродством только к фосфатазе, но не к иммуноглобулинам каких-либо других видов, что весьма обычно для традиционных конъюгатов, и 2) изотипическую специфичность антиглобулинов можно определять без предварительного получения конъюгатов тестируемых антител с ферментом.

Для оценки реального вклада «коротких замыканий» проводят адсорбцию непосредственно на носителе тех компонентов, которые могут служить мишенью для побочных взаимодействий, а затем последовательно добавляют остальные компоненты тест-системы. Например, для проверки возможности прямого узнавания антигена изотип-специфическими агентами («замыкание» типа А) раствор первичных антител в анализе заменяют буфером. Для того чтобы установить, происходит ли прямое взаимодействие между мостиковыми и первичными антителами («замыкание» типа Г), иммуноглобулины того же класса и из того же вида, что и первичная антисыворотка, адсорбируют непосредственно на подложке и завершают реакцию, добавляя все оставшиеся компоненты (в случае a-ELISA это мостиковые антиглобулины, ИФК и субстрат щелочной фосфатазы).

2. Проверка специфичности изотип-специфических антиглобулинов. Специфичность изотип-специфических антиглобулинов является ключевым фактором для надежного определения классов иммуноглобулинов, участвующих в иммунном ответе. Проверка специфичности этих агентов легко осуществляется в режиме a-ELISA. Для этого на поверхности лунок стандартной

Таблица 14-3. Определение специфичности изотип-специфических антиглобулинов с помощью метода a-ELISA

Добавлено (нг)	SIgA[1])	IgM	IgG1	IgG2
100	2,997±0,065; 2,18[2])	3,123±0,191; 6,11	3,073±0,103; 3,34	2,949±0,100; 3,40
30	1,389±0,067; 4,79	1,485±0,024; 1,62	1,470±0,062; 4,22	1,404±0,070; 4,99
10	0,647±0,025; 3,86	0,863±0,061; 7,07	0,785±0,037; 4,71	0,794±0,032; 4,03
3	0,224±0,026; 11,61	0,331±0,033; 9,97	0,261±0,065; 24,9	0,290±0,045; 15,52
1	0,084±0,005; 5,95	0,143±0,017; 11,89	0,125±0,012; 9,6	0,132±0,024; 18,18
0,3	0,032±0,005; 15,63	0,044±0,006; 13,64	0,054±0,008; 14,81	0,075±0,007; 9,33
0,1	0,022±0,005; 22,73	0,024±0,006; 25,0	0,040±0,003; 7,5	0,051±0,006; 11,76
0,003	0,010±0,002; 20,00	0,018±0,005; 27,78	0,039±0,007; 17,95	0,004±0,005; 11,36
IgA——100[3])		0,152±0,017	0,345±0,076	0,102±0,004
IgM——100	0,008±0,001		0,045±0,05	0,065±0,017
IgG1——100	0,036±0,001	0,049±0,005		0,084±0,027
IgG2——100	0,064±0,026	0,011±0,005±0,086± ±0,002		

[1]) В каждом из столбцов таблицы приведены значения A_{400}, полученные при тестировании различных количеств (даны в столбце слева) Ig определенного типа (указаны над столбцами) с использованием антисыворотки к данному Ig (в данном случае анти-IgA).

[2]) n=3 для всех данных в этой таблице.

[3]) В последних четырех строках приведены значения A_{400}, полученные при тестировании гомологичных антиглобулинов, например анти-IgA против IgA, по отношению к 100 нг каждого из трех гетерологичных иммуноглобулинов. Данные представлены в виде скорректированных значений оптической плотности при 400 нм±стандартные отклонения; приведены также коэффициенты вариации. Все данные взяты из работы (Butler et al., 1980a).

платы вместо антигена адсорбируют различные количества очищенных иммуноглобулинов того же вида, что и первичные антитела, и определяют возможность протекания перекрестных реакций, подобно тому, как это показано в табл. 14-3. Количественная оценка способности к перекрестной реакции может быть получена, если: а) известны количества каждого из адсорбируемых в лунках Ig и б) известно, что каждый из адсорбированных Ig полностью свободен от примесей иммуноглобулинов других изотипов. В частности, в работе Батлера и др. (Butler et al., 1980a) такую оценку получили, исходя из условия б) и 60% адсорбции иммуноглобулинов на Immulon[R] 2 (производство фирмы Dynatech) в использованном диапазоне концентраций[1]).

3. Определение титра компонентов системы a-ELISA. Удобнее всего титровать компоненты системы с помощью модифицированного варианта методики, использованной для получения данных табл. 14-3. В такого рода предварительных тестах вполне можно обойтись лишь ограниченным набором разведений Ig. В их число должны войти разведения, соответствующие минимальному и максимальному количествам специфических антител, которые предстоит определять в данной системе, например 0,05 и 100 нг на лунку. Целесообразно включить в тест также два промежуточных разведения.

Для титрования изотип-специфических антиглобулинов используют мостиковые антитела и ИФК в разведениях около 1 : 500 и 1 : 100 соответственно (т. е. в их обычной или несколько более высокой концентрации). Разведение изотип-специфических антиглобулинов можно варьировать в диапазоне 1 : 250—1 : 4000. Результаты титрования оценивают по: а) наклону кривой титрования, б) значению A_{405} спустя 1 ч после инкубации и в) возможностям экономии реагента. При этом стремятся выбрать максимальное разведение, обеспечивающее достаточно высокую чувствительность (по A_{405}), и иметь на кривой титрования достаточно протяженный линейный участок с наклоном в области 0,9—1,0. Для большинства изотип-специфических агентов это, как правило, разведение 1 : 1000 или 1 : 2000.

Аналогичным образом титруют и мостиковые антиглобулины. При этом используют тот же метод анализа, но уже при фиксированной концентрации изотип-специфических антиглобулинов (например, при разведении 1 : 1000), варьируя разведение мостиковой антисыворотки в диапазоне 1 : 500—1 : 4000. Для выбора оптимального разведения используют те же критерии, что и при подборе концентрации изотип-специфических антиглобулинов.

[1]) В действительности степень адсорбции Ig зависит от изотипа (Cantarero et al., 1980). В целом полимерные иммуноглобулины связываются лучше (до 80%), а Ig G несколько хуже.

Аналогичное тестирование ИФК в диапазоне разведений 1 : 500—1 : 8000 проводят с использованием подобранных оптимальных разведений изотип-специфических антиглобулинов и мостиковых антител. И в этом случае выбор оптимального разведения ИФК основывается на той же совокупности критериев. Мы, как правило, работали с разведениями препаратов ИФК 1 : 1000 и 1 : 2000.

III. Определение специфических антител в микровариантах метода ELISA

А. Адсорбция антигенов на платах для микротитрования

1. Адсорбционные свойства белков и пластиковых подложек. Эффективность проведения микроанализа методом a-ELISA существенно зависит от формирования слоя иммобилизованного антигена путем адсорбции на поверхности пластика. Ранее мы показали, что прочность адсорбции белка на пластиковой подложке зависит от его концентрации (Cantarero et al., 1980). Было установлено, что в определенном диапазоне концентраций имеется линейная зависимость между количеством добавленного и адсорбировавшегося белка. Это так называемый диапазон «независимого связывания». В нашей лаборатории было показано, что пластики типа Immulon 1 и Immulon 2 ведут себя аналогичным образом, при этом Immulon 2, обладает более высокой адсорбционной емкостью. Верхний предел диапазона «независимого связывания» для Immulon 2 составляет 100—200 нг белка на лунку.

2. Влияние концентрации антигена на неспецифическое связывание. На первом этапе компоненты образца и компоненты системы определения могут связываться непосредственно с полистиролом даже в присутствии 0,05% твина-20 (неопубликованные данные). Непосредственное связывание компонентов образца может приводить к дополнительному артефактному обнаружению иммуноглобулинов, не обладающих специфичностью к данному антигену, а адсорбция на пластике самих компонентов системы определения вызывает фоновое связывание, которое может существенно искажать кривые титрования. Оба названных процесса протекают не очень интенсивно и, вероятно, оказывают лишь незначительное влияние на точность определения в системах ELISA с относительно низкой чувствительностью. Однако в случае систем, предназначенных для тестирования специфических антител в низких концентрациях, эти же процессы могут очень значительно искажать результаты анализа.

Степень прямого неспецифического связывания белков с подложкой можно понизить, увеличив количество связанного

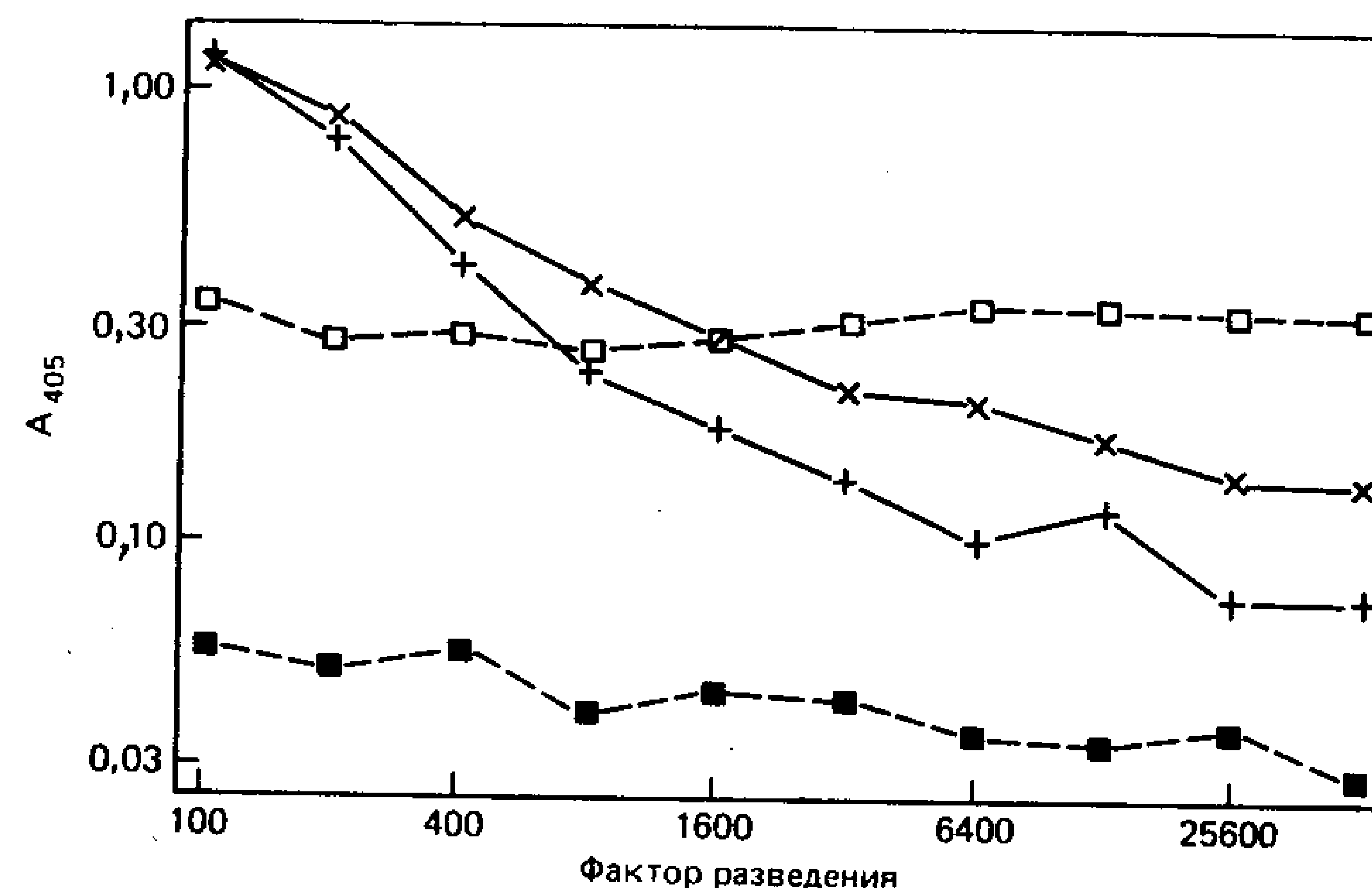


Рис. 14-4. Влияние дополнительного покрытия лунок плат с добавлением в буфер для связывания 0,1% желатины ((см. текст) на микротитрование методом ELISA антифлуоресцеиновых IgA в ФСБ, содержащем 0,05% твина-20. x-Образные крестики — титрование в лунках, поверхность которых покрыта слоем антигена; +-образные крестики — то же, но с дополнительным покрытием; светлые квадратики — титрование в лунках, не покрытых антигеном; темные квадратики — то же, но с дополнительным покрытием.

антигена. В то же время при повышенном содержании антигена на подложке в ходе анализа может происходить существенное вымывание антигена в жидкую фазу, где он может выступать уже в роли конкурентного ингибитора (Peterman, 1985). Нам удалось отчасти преодолеть проблему прямого связывания с подложкой с помощью создания дополнительного покрытия (рис. 14-4). После первоначального покрытия лунок платы слоем соответствующего антигена (3 ч при 37 °С) раствор антигена удаляют и проводят дополнительную обработку 0,1%-ным раствором желатины в специальном буфере для связывания (Butler et al., 1978b). Такое дополнительное покрытие пластика позволяет значительно снизить влияние связывания с поверхностью лунок других компонентов системы помимо антигена. При этом диссоциация желатины с поверхности и ее переход в жидкую фазу в ходе анализа не должны создавать особых проблем. Дополнительное покрытие желатиной может снижать чувствительность некоторых систем за счет маскировки антигенных детерминант (антиген-специфические варианты ELISA) или центров узнавания антител (сэндвич-методы). И все-таки, несмотря на указанные ограничения, выигрыш в специфичности и линейности ответа делает эту процедуру весьма целесообразной.

Б. Титрование первичных антител

1. Предварительное титрование первичной сыворотки или секрета. Довольно часто исследователь приблизительно представляет, каков может быть титр специфических антител в сыворотке. В противном случае мы прибегаем к тестированию серии логарифмических разведений сыворотки, как показано на рис. 14-5, *А*. Для приготовления разведений в зависимости от конкретной системы можно использовать ФСБ, содержащий 0,05% твина-20 (ФСБ-Т), или ФСБ-Т, содержащий также 0,1% желатины или овальбумина. На одной плате можно протестировать 20 новых образцов сыворотки в присутствии контроля — повторенной дважды серии разведений стандартного препарата. В тот момент, когда в лунке со стандартным препаратом в максимальной концентрации значение A_{405} достигает заранее установленного максимума, проводят автоматическое сканирование всей платы (разд. III.Г.1) или останавливают реакции добавлением 1М NaOH. Если разведения готовят вручную, то для экономии времени оператора на параллельных платах те же самые разведения препаратов можно протестировать на специфическую активность антител других изотипов. Как правило, такое предварительное титрование серии образцов, случайно выбранных из большого числа препаратов в ходе популяционного тестирования, позволяет исследователю установить подходящее начальное разведение анализируемых сывороток для последующего рутинного определения антител данного изотипа.

А

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10^1						10^3					
B	10^2						10^4					
C	10^3						10^5					
D	10^4						10^6					
E				10^2								
F				10^3								
G				10^4	К	К						
H				10^5	К	К						

Б

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1/100						$\frac{1}{10^4}$					
B	1/300						$\frac{1}{3\times10^4}$					
C	1/900						$\frac{1}{9\times10^4}$					
D	1/2700						$\frac{1}{2,7\times10^5}$					
E				1/30								
F				1/90								
G				1/270	К	К						
H				1/810	К	К						

Рис. 14-5. Постановка опыта при проведении антиген-специфического анализа микрометодом ELISA. *А.* Предварительное титрование анализируемых образцов. Тестируются серии из 4 10-кратных разведений для каждого из 20 анализируемых образцов и дважды повторенная серия 2-кратных разведений стандартного образца [5(A—F) и 6(A—F)]. К — контроль; в лунки вместо первичной антисыворотки вносят буферный раствор. Стрелками показано направление нарастания разведения в стандартном и анализируемом образцах [например, в рядах 1(A—D), 4(E—H) и 7(A—D)]. *Б.* Серии 3-кратных разведений для окончательного стандартного анализа 20 образцов в плате [указаны разведения для образцов в рядах 1(A—D), 4(E—H) и 7(A—D)]. К — лунки, соответствующие контролю.

2. Серии разведений, используемые при точном титровании исследуемых образцов. На основании данных предварительного титрования или имеющегося опыта работы с аналогичными препаратами готовят первичные разведения тестируемых образцов с использованием приемов, позволяющих избежать ошибок разведения. Для приготовления больших разведений используют серии промежуточных разведений, всякий раз отбирая и перенося сравнительно большие объемы растворов. Действуя таким образом, мы не обнаруживали существенных различий по сравнению с точностью, достигаемой с помощью диспенсеров, работающих по принципу непосредственного или же воздушного вытеснения жидкости (Dierks, 1985).

Из первичных разведений препаратов последующие разведения могут быть приготовлены вручную или автоматически после внесения их в соответствующие лунки платы для микротитрования с помощью автоматических устройств для разведения проб (например, типа «Autodilutor III», Dynatech; «Medimixer», Flow или «Pro/Pette», Cetus). При работе с такими устройствами первичное разведение все же должно быть сделано вручную, поэтому в некоторых случаях экономия времени на последующих разведениях может оказаться слишком незначительной, и ее может быть недостаточно даже для того, чтобы окупить стоимость прибора. На рис. 14-5, *Б* показан способ заполнения платы, которым обычно пользуются в нашей лаборатории. В колонках 5 и 6 содержится серия 2-кратных разведений препарата, выбранных в рамках линейной области кривой титрования (разд. IV.A). Этот препарат применяют в качестве стандарта сравнения для тестирования антител данного изотипа. Оставшиеся ячейки платы используют для тестирования серий из четырех 3-кратных разведений 20 исследуемых образцов. По опыту нашей работы тестирование «дублей» для каждого разведения исследуемого образца не дает существенного выигрыша в точности определения. Все же для начинающих лаборантов рекомендуется готовить для каждого образца повторные серии разведений, а еще лучше — тестировать каждый образец в два приема. Использование серий 3-кратных разведений исследуемых образцов, как оказалось, надежно обеспечивает тестирование антител в подходящем диапазоне концентраций и с достаточной точностью определения.

3. Определение содержания минорных антител. При тестировании антител тех изотипов, которые для данных препаратов являются минорными, например при тестировании IgE в сыворотке человека или IgA в сыворотке крупного рогатого скота,

высокий уровень основных компонентов (IgG), специфичных к тому же антигену, может существенно искажать характер кривой титрования (Butler at al., 1980a; Butler, McGivern, 1985). Для решения этой проблемы можно удалить из образца основную массу IgG либо адсорбцией на убитых формалином клетках *S. aureus*, либо фракционированием образца с помощью хроматографии или ультрацентрифугирования. Можно использовать и анализ в обратнофазовой системе, подобно тому, как это описано в работе Цейса и др. (Zeiss et al., 1973). Данный вопрос дополнительно обсуждается в разделе, посвященном антигенной конкуренции.

4. Условия инкубации. В наших работах не наблюдалось максимального связывания мономерных и димерных антител с значениями собственных констант $K_a > 10^7$ л/моль в ходе 1-часовой инкубации при комнатной температуре (Koertge, 1984). Димерные антитела достигают наибольшей степени связывания несколько быстре, чем мономерные, причем и те, и другие максимально связываются при 24-часовой инкубации. По данным других исследователей (Butler, неопубликованные данные) максимальное связывание свиных антител к флуоресцеину практически достигалось за 5,5 ч при 37 °C. Перемешивание реакционных смесей в лунках панелей с помощью специального встряхивателя не повышает скорости связывания, но, судя по всему, обеспечивает более однородные условия протекания реакций в плате. Приведенные наблюдения свидетельствуют о том, что время инкубации, необходимое для максимального связывания первичных антител, зависит от природы самих антител, т. е. от их аффинности, валентности и т. д. Оптимальное время инкубации следует определять эмпирически для каждой конкретной системы анализа.

В. Добавление реагентов, завершающих анализ

1. Последовательность реакций и времена инкубации. После инкубации с первичными антителами в течение ночи при 4 °C платы промывают (разд. III.B.2) и обрабатывают раствором изотип-специфических антиглобулинов с разведением 1 : 500—1 : 2000. Для равномерного распределения реагентов по всем лункам удобно использовать многоканальные пипетки (типа «Titertek», Flow). Платы инкубируют со встряхиванием 2 ч при комнатной температуре, промывают и обрабатывают раствором мостиковых антител в разведении 1 : 500—1 : 4000 (о титровании реагентов для анализа см. разд. II.B.3). После инкубации в тех же условиях, что и на предыдущей стадии, платы промывают и добавляют раствор ИФК в разведении 1 : 1000 или 1 : 2000. Было замечено, что при инкубации с ИФК в течение ночи при 4 °C чувствительность измерений повышается. Такой режим работы очень удобен, поскольку позволяет лаборанту

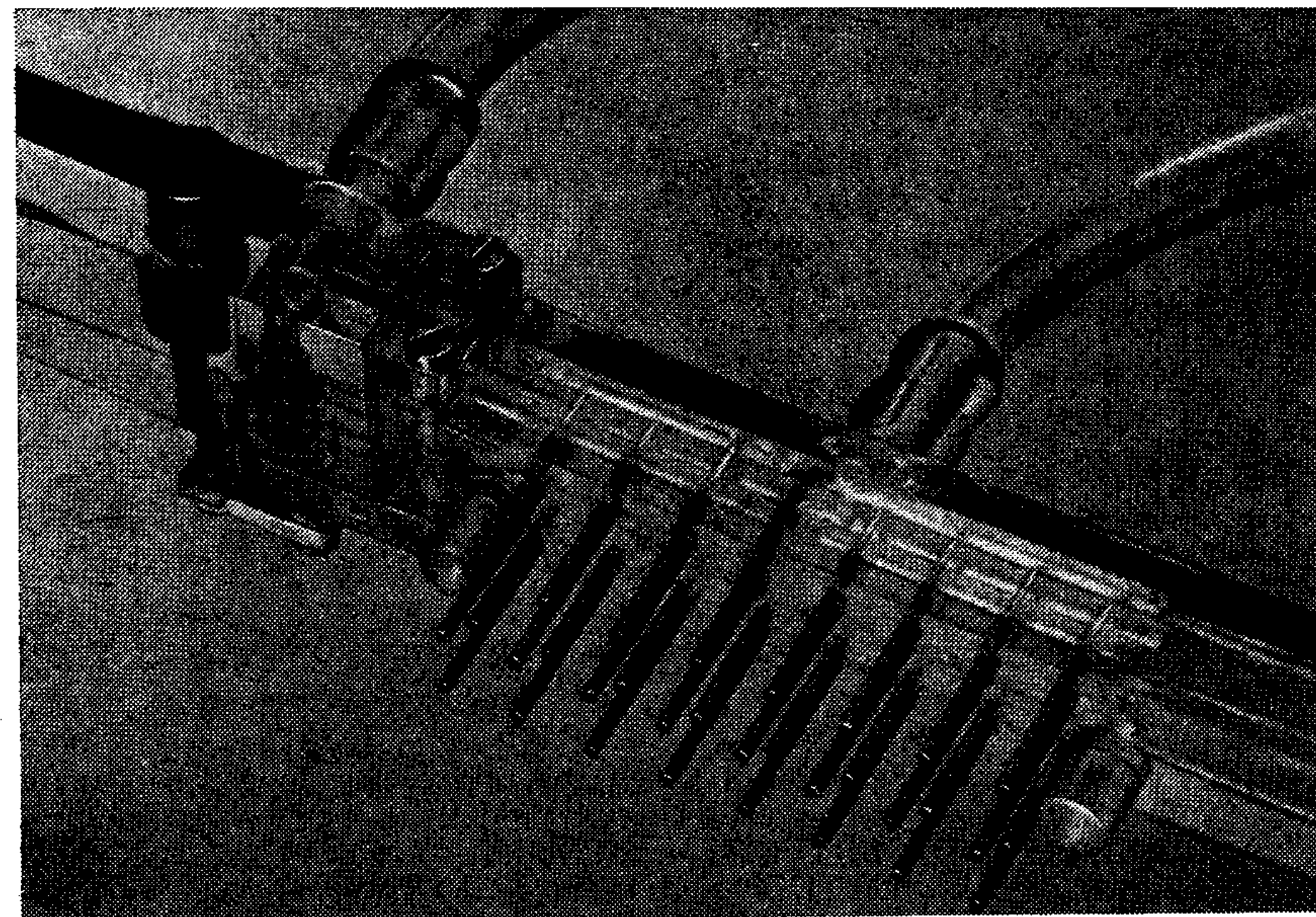


Рис. 14-6. Устройство для промывания плат в методе ELISA. Промывочный раствор из резервуара под действием силы тяжести подается в 16 лунок через 16 наконечников, расположенных почти у дна лунок. Использованный промывочный раствор постоянно откачивается аспиратором через более короткие трубочки, примыкающие к каждому из наконечников. Разработано H. Breier, J. E. Butler, F. Klobasa в Institute for Animal Husbandary and Behavior Мариензее, ФРГ.

закончить анализ на следующее утро.

При необходимости более быстрого анализа времена инкубации можно сократить за счет использования растворов антител с более высокими титрами. Анализ по методу a-ELISA можно полностью завершить и за один день (при условии, что за предыдущую ночь была пройдена стадия адсорбции антигена), однако при этом придется смириться с некоторой потерей в чувствительности определения.

Если скорость получения результатов анализа не имеет значения, то можно проводить и более длительную инкубацию, используя при этом растворы соответствующих реагентов с бо́льшим разведением. Это позволит уменьшить расход дефицитных или дорогостоящих реагентов.

2. Способы промывания плат и проблемы потери реагентов. Лунки платы для микротитрования промывают 0,15 M раствором NaCl, содержащим 0,05% твина-20. Мы проводим этот этап анализа с помощью комбинированного диспенсера-аспиратора, разработанного в нашей лаборатории в сотрудничестве с X. Брейером из Института животноводства и поведения живот-

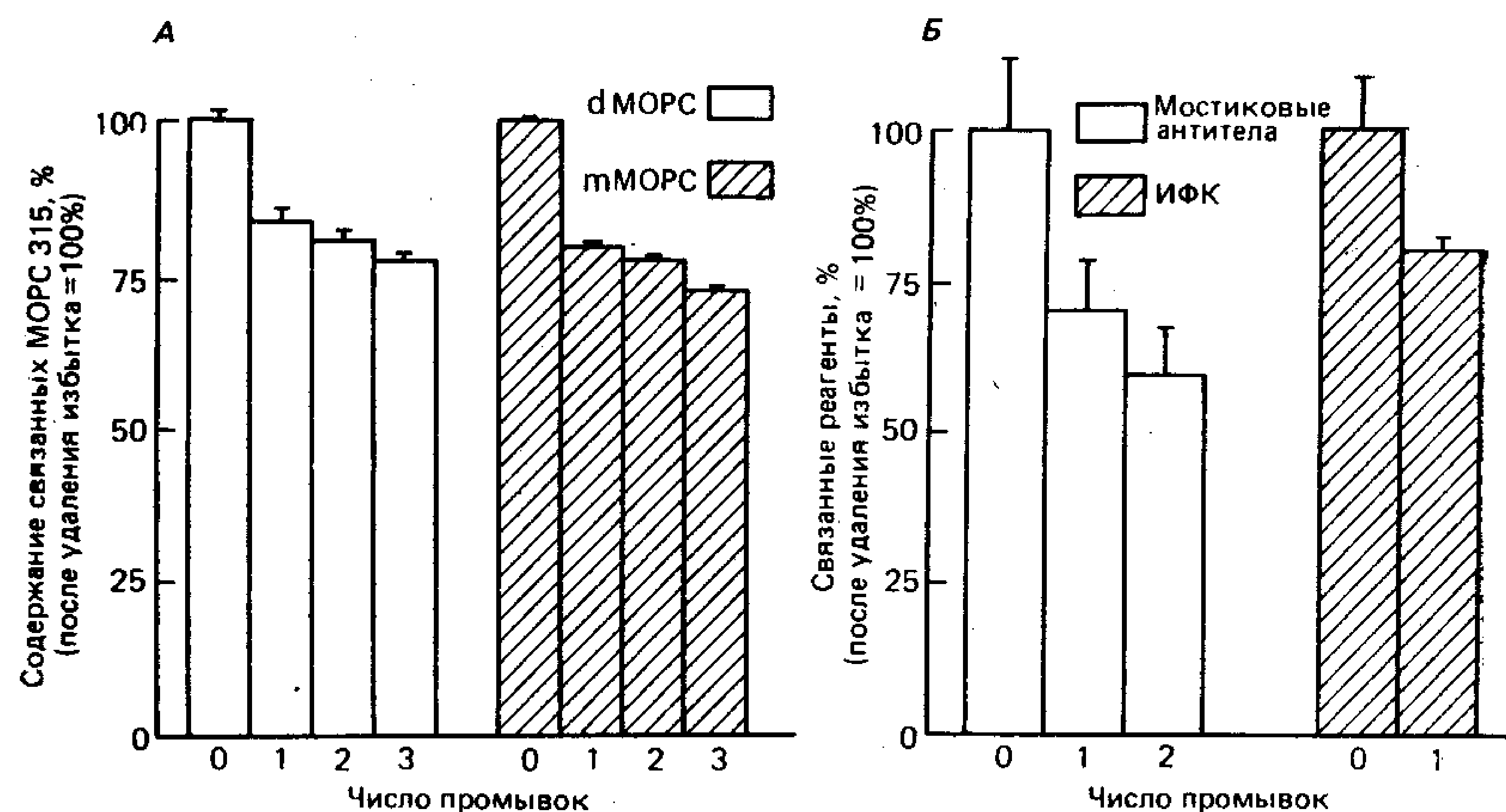


Рис. 14-7. Потеря первых антител и других реагентов при проведении анализа методом a-ELISA. *А*. Потери мономерных (mМОРС) и димерных (dМОРС) ДНФ-специфичных IgA (МОРС 315) с поверхности лунок платы для микротитрования, покрытых слоем ДНФ-желатины. За 100% принимают количество антител, обнаруживаемых на поверхности после удаления избытка непрореагировавших антител. *Б*. Потери мостиковых антител и ИФК при проведении анализа. Пояснения см. на рисунке. За 100% принимают количество реагентов, остающихся после удаления соответствующего раствора, но до промывания лунок.

ных в Мариензее, ФРГ (рис. 14-6). В течение 10 с промывают одновременно 16 лунок в двух соседних рядах. Затем промывочную головку этого устройства, оснащенную вентилем, перекрывающим поток жидкости, перемещают для промывания следующих двух рядов. Встроенный фильтр (размер пор 8 мкм) предохраняет наконечники диспенсера от засорения механическими примесями из резервуара с промывочным раствором. (16-Литровый резервуар необходимо периодически мыть хромпиком.)

Промывка плат сопровождается частичной десорбцией антигена, которая при работе в режиме независимого связывания (см. выше) может достигать не более чем нескольких процентов общего количества первоначально адсорбированного материала (Cantarero et al., 1980). Если для первоначального покрытия плат использовали бо́льшие количества антигена, то процент десорбции может оказаться несколько выше. Важно учитывать, что десорбция, происходящая в ходе инкубации с первичными антителами, может по механизму конкурентного ингибирования повлиять на процесс связывания первичных антител (Peterman, 1985).

Как показано на рис. 14-7, промывка платы может сопровождаться также небольшими потерями первичных антител и

остальных реагентов, правда, процент их потерь относительно невелик. К тому же неизвестно, происходит ли десорбция каждого из этих реагентов как такового или в виде комплекса с реагентами, связавшимися на предыдущих стадиях. (Мостиковые антитела, например, могут десорбироваться сами по себе или в комплексе с изотип-специфическими антиглобулинами.)

Г. Реакция ИФК с субстратом

1. *Контроль ферментативной реакции.* После инкубации в течение ночи с ИФК плату вновь промывают и добавляют в лунки раствор *п*-нитрофенилфосфата (1 мг/мл), используемого в качестве хромогенного субстрата. Соответствующий буферный раствор хранят при 4 °С, а перед растворением в нем субстрата нагревают до комнатной температуры. В нашей лаборатории измеряют оптическую плотность в лунках или останавливают реакцию обычно после инкубации в течение 30—120 мин. Как уже упоминалось, реакцию можно останавливать добавлением 1 М NaOH. Можно также автоматически сканировать плату после того, как в лунке с минимальным разведением стандартного препарата достигается заданное значение A_{405}. Для измерений изменения окраски в результате ферментативных превращений хромогенных субстратов в лунках обычно используют специальные устройства для сканирования как ручные (типа

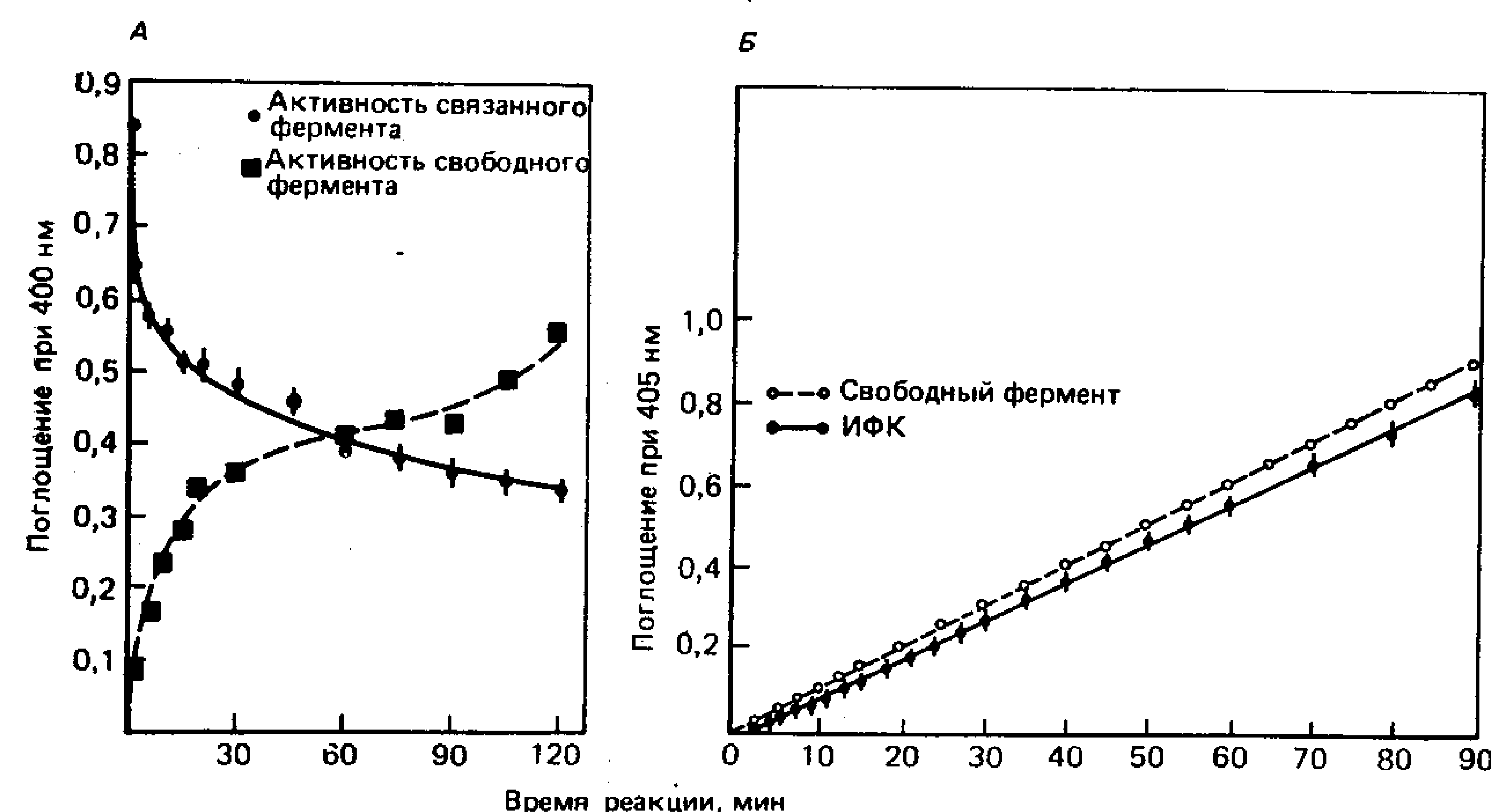


Рис. 14-8. Высвобождение щелочной фосфатазы (ЩФ) в ходе реакции с субстратом при анализе методом a-ELISA и влияние этого процесса на активность фермента. *А*. Изменение количеств связанной и свободной ЩФ в лунке в течение первых 120 мин после добавления ИФК при комнатной температуре. *Б*. Сравнение ферментативной активности свободной ЩФ и активности ИФК в течение первых 90 мин после добавления ИФК.

MR 590, Dynatech; EL 309, Biotek), так и автоматические (например, MR 600, Dynatech, EL 310 Biotek; «Multiscan», Flow). В качестве отрицательного контроля принимают значения A_{405} в лунках, в которые вместо первичных антител был добавлен соответствующий буферный раствор (ФСБ-Т или аналогичный). Во избежание ошибок, связанных с «краевым эффектом», наблюдаемым при сканировании некоторых плат, целесообразно контрольные препараты вносить не только в крайние лунки, но и во внутренние (см. рис. 14-5).

2. *Высвобождение фермента на этапе реакции с субстратом.* ИФК принципиально отличается от ферментных конъюгатов, обычно применяемых в различных вариантах метода ELISA. После добавления буферного раствора, pH 9,8, в котором проводят реакцию с субстратом, происходит постепенная диссоциация ИФК с переходом свободного фермента в раствор (рис. 14-8, *А*). При проведении специальных исследований с применением дважды меченого ИФК (см. рис. 14-2, *Б*) было показано, что фермент высвобождается не в форме ИФК, а в свободном виде (Koertge et al., 1985; Koertge, 1984). Было также установлено, что высвобождающаяся щелочная фосфатаза обладает такой же активностью, что и связанный фермент (рис. 14-8, *Б*). В то же время есть определенные основания считать, что фосфатаза, входящая в состав ИФК, несколько отличается от исходного фермента (Koertge, 1984).

IV. Особенности определения специфических антител с помощью микроварианта метода ELISA

А. Зависимость эффективности определения от связывания первичных антител

1. *Характер кривой титрования в методе ELISA.* Сигмоидный профиль кривой титрования хорошо знаком каждому, кто использует метод ELISA для определения специфических антител. Хотя уже давно принято считать, что максимальное связывание антител происходит в линейной области кривой, достоверно показано это было лишь в последние годы (Koertge, 1984; Koertge, Butler, 1985). На рис. 14-9 представлена зависимость между связыванием первичных антител и ИФК в режиме a-ELISA на линейном участке кривой титрования. Эти данные демонстрируют также постоянство степени связывания первичных антител в линейной области. В этих условиях степень связывания антител с иммобилизованным на подложке антигеном, в данном случае с комплексом [гаптен — носитель], совпадает с максимальной степенью связывания тех же антител с тем же гаптеном в условиях большого избытка антигена в совершенно независимой системе (динитрофенилированная суспензия *E. coli*)

(Koertge, 1984; Koertge, Butler, 1985). Таким образом, для изученной модельной системы линейный участок кривой действительно соответствует области максимального постоянного уровня связывания антител. Из рис. 14-9 видно также, что в то время как сами первичные антитела линейно связываются на протяжении трех логарифмических единиц шкалы, их косвенное обнаружение в ходе последующего анализа характеризуется кривой иного рода. Это означает, что сигмоидный профиль кривой титрования в микроварианте метода ELISA обусловлен не связыванием первичных антител с иммобилизованным на подложке антигеном, а какими-то другими причинами.

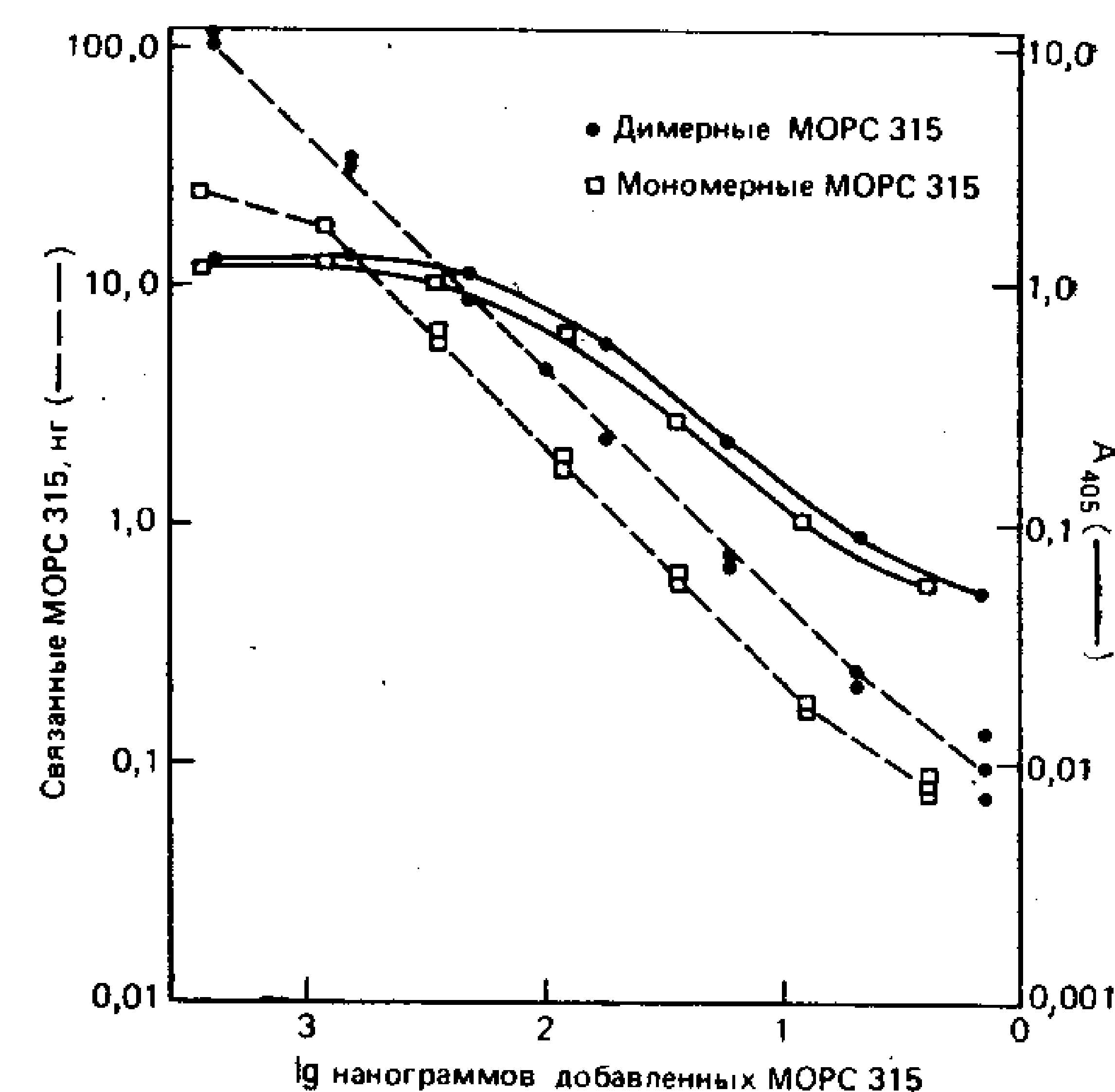


Рис. 14-9. Соотношение между связыванием первых антител (мономерные или димерные МОРС 315) с иммобилизованной ДНФ-желатиной (прерывистые линии) и их обнаружением при анализе методом a-ELISA (сплошные линии).

2. *Влияние размера конъюгата.* Сигмоидный характер кривой титрования в ее верхней области, т. е. в области относительно высокой загрузки первичными антителами, позволяет предположить, что а) в области более высокой концентрации антител пространственные затруднения для работы системы детектирования возрастают или б) связывание конъюгатов с различным молярным соотношением фермент : антитело или с ферментативной активностью, отличной от активности конъюгатов, преимущественно связывающихся в области низкой концентрации антител, происходит избирательно. Второе из названных предположений кажется маловероятным ввиду однородности состава ИФК, используемого в a-ELISA (см. рис. 14-2). Поэтому мы исследовали влияние на форму кривой титрования конъюгатов различного состава с разной способностью вызывать пространственные затруднения при связывании. Для этого использовали системы, схематически показанные на рис. 14-1. Размер частиц конъюгата определяли ультрацентрифугированием в сахарозном градиенте аналогично тому, как это делали при получении данных на рис. 14-2. Было установлено, что конъюгаты, полученные с помощью глутарового альдегида, представляют собой крупные агрегаты, в то время как конъюгаты на основе Fab′ однородны по размеру и имеют мол. массу

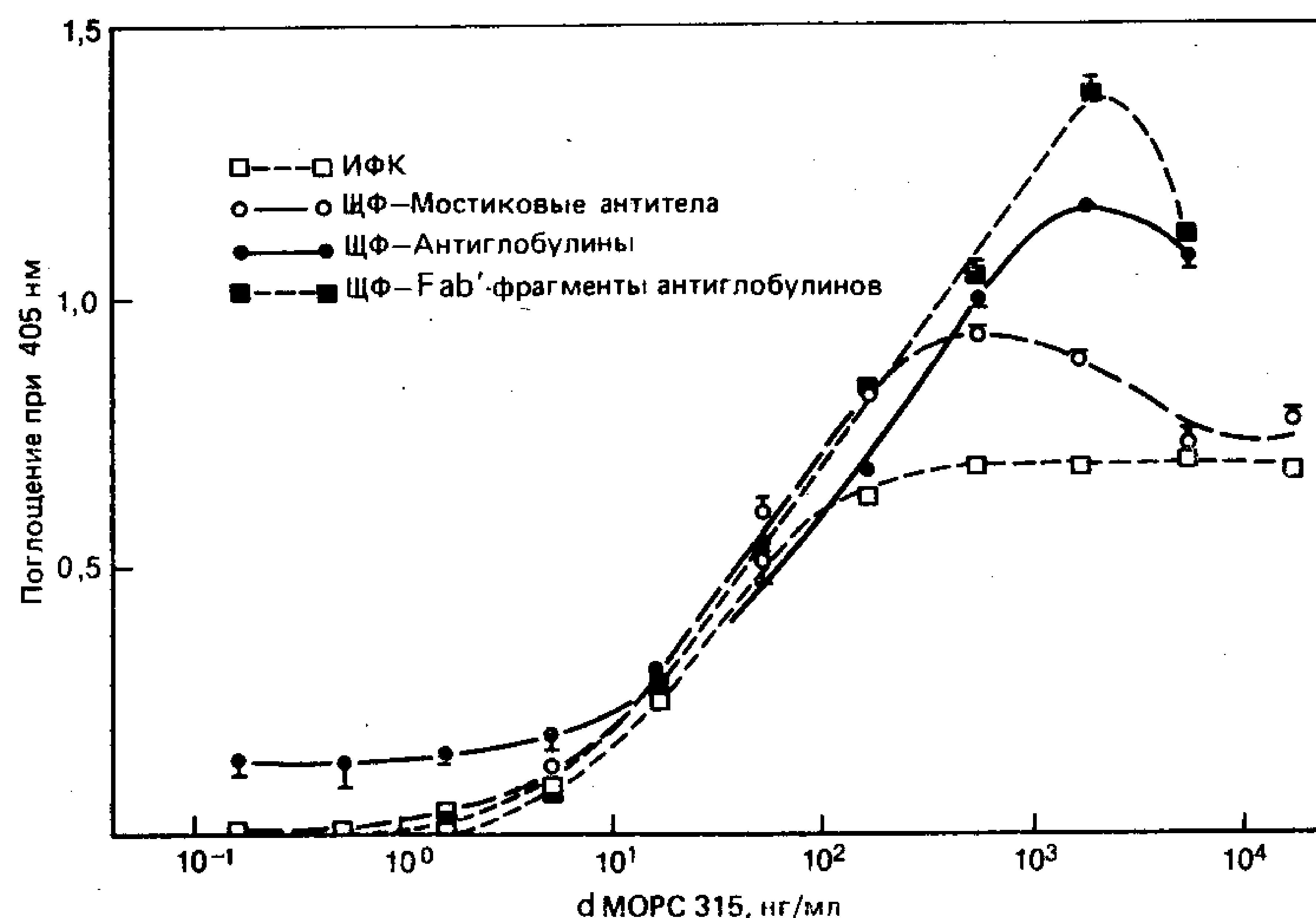


Рис. 14-10. Влияние размера компонентов системы детектирования на эффективность антиген-специфического анализа методом ELISA. Обозначения (см. на рисунке) соответствуют системам детектирования, изображенным на рис. 14-1. Времена реакции были подобраны так, чтобы для разных кривых получить сходные значения A_{405} в линейной области.

~140 000. Охарактеризованные таким образом препараты были использованы для определения активности антител к динитрофенильным группам по отношению к ДНФ-желатине, иммобилизованной на поверхности лунок. Полученные результаты (рис. 14-10) согласуются с выводами о том, что сигмоидный характер кривой титрования в области высоких концентраций антител обусловлен пространственными затруднениями. Наибольшим сходством с кривой связывания первичных антител обладает кривая титрования конъюгата, имеющего состав [1 молекула Fab′ — 1 молекула щелочной фосфатазы].

Данные, представленные на рис. 14-10, свидетельствуют также о том, что на кривой титрования в режиме a-ELISA, т. е. с использованием ИФК, отсутствует загиб, часто наблюдаемый при высокой концентрации антител. Такой загиб может быть результатом ингибирования свободными антителами, присутствующими в препаратах конъюгатов, которые были получены с использованием глутарового альдегида. Участок ровного плато на кривой титрования по методу a-ELISA, вероятно, обусловлен постепенным добавлением реагентов, благодаря чему оказывающие ингибирующее действие свободные антитела в раствор не выделяются (Koertge, 1984; Koertge, Butler, 1985).

3. Антигенная конкуренция. Теоретические аспекты проблемы антигенной конкуренции, особенно важной в случае определения антител минорных классов, таких, как IgE, проиллюстри-

Таблица 14-4. Антигенная конкуренция в микроварианте метода ELISA: количественные аспекты

Антиген или антитела	**мкг**	**Связывается[1]) мкмолей**	**Связывается Ат[1]), нг**	**Молярное соотношение Аг : Ат[2])**
Антиген[3])	200	$2 \cdot 10^{-3}$		
Специфические антитела сыворотки человека				
IgG (1 : 25)	48,4	$3 \cdot 10^{-4}$	48 400	6,7
IgG (1 : 500)	2,42	$1{,}5 \cdot 10^{-5}$	2 420	133
IgA (1 : 25)	10	$1 \cdot 10^{-5}$	10 000	20
IgA (1 : 500)	0,5	$3{,}12 \cdot 10^{-6}$	500	641
IgM (1 : 25)	3,72	$2{,}33 \cdot 10^{-5}$	3 720	85,8
IgM (1 : 500)	0,18	$1{,}86 \cdot 10^{-7}$	186	$1 \cdot 10^{4}$
IgE (1 : 25)	$5 \cdot 10^{-3}$	$2{,}8 \cdot 10^{-8}$	5	$7{,}1 \cdot 10^{4}$
IgE (1 : 500)	$2{,}5 \cdot 10^{-4}$	$1{,}39 \cdot 10^{-9}$	0,25	$1{,}44 \cdot 10^{6}$
Всего	1:25=$3{,}3 \cdot 10^{-4}$ 1:500=$1{,}84 \cdot 10^{-5}$			

В разведении 1 : 25 отношение Аг/Ат=6
В разведении 1 : 500 отношение Аг/Ат=108

[1]) Исходят из 50%-ного связывания добавленного антигена и 100%-ного связывания добавленных антител.
[2]) Молярное соотношение антиген (Аг) : связанные антитела (Ат), исходя из предположения об отсутствии конкуренции и 100%-ном связывании антител.
[3]) Молекулярная масса 50 000.

рованы примером в табл. 14-4. Расчеты основаны на нескольких допущениях: а) считают, что содержание специфических антител, помимо IgE, составляет 10%, а содержание специфических IgE — 25% от общего содержания IgE; б) в платах Immulon 2 стабильно адсорбируется 100 нг белка на лунку и в) относительное содержание различных классов Ig в образце соответствует их обычному содержанию в человеческой сыворотке. Рассмотрение примера, приведенного в табл. 14-4, показывает, что в условиях, позволяющих достичь 100%-ного связывания антител сыворотки, т. е. при наличии 100-кратного избытка антигена, чувствительность определения IgE (разд. IV.Б) должна характеризоваться величиной 0,25 нг на лунку или 1,25 нг/мл. При разведении сыворотки, соответствующем 5 нг на лунку, избыток антигена должен быть лишь 6-кратным. В этих условиях аффинность большинства антител оказывается недостаточной для обеспечения полного связывания с иммобилизованным антигеном. Следовательно, антитела будут связываться избирательно, и если аффинность антител IgE окажется ниже, чем у существенной доли антител IgG, то их определение в таком режиме будет практически невозможно. Независимо от концентрации и аффинности поливалентные IgM и димерные IgA в этой ситуации могут оказаться в более выгодном положении благодаря их

более высокой авидности. В качестве примеров, подтверждающих правильность этого представления, можно упомянуть данные нашей лаборатории по определению бычьих IgM на фоне IgG (Butler et al., 1980), а также бычьих димерных антител типа МОРС-315 на фоне этих же мономерных антител (Koertge, 1984).

Для решения этой проблемы можно использовать следующие приемы: а) увеличивать концентрацию иммобилизованного антигена, б) удалять из смеси конкурирующие антитела, присутствующие в высокой концентрации, например IgG, или в) использовать альтернативную схему анализа: сначала связывать иммуноглобулины данного класса, например IgE, и затем тестировать их антиген-связывающую активность. Последний прием был успешно использован в работе Цейса и др. (Zeiss et al., 1973), мы же остановились на втором. Первый из названных приемов, вероятно, является наименее эффективным, поскольку, как было показано выше, возникающие при его применении пространственные затруднения могут существенно снижать эффективность детектирования еще до насыщения антигена.

Б. Влияние аффинности и авидности антител

1. Теоретические аспекты. Ввиду поликлональной природы иммунного ответа в любой тестируемой сыворотке или секрете содержится широкий набор антител различных изотипов с различной аффинностью. Ограниченность поверхности лунки платы и адсорбционных возможностей пластиковой подложки приводит к тому, что в ряде случаев количественное соотношение антиген : антитело оказывается выгодным для связывания одних антител и невыгодным для других. В ранних работах, посвященных методу ELISA (Engvall, Perlmann, 1972), авторы считали, что его можно использовать для определения специфических антител независимо от их аффинности. Однако все больше и больше исследователей приходит к выводу, что аффинность антител оказывает существенное влияние на их определение методом ELISA (Butler et al., 1978; Lehtonen, Eerola, 1982; Peterfy et al., 1983; Nimmo et al., 1984). Если бы аффинность антител не играла существенной роли, то с помощью ELISA в определенных условиях можно было бы обнаруживать все присутствующие в смеси специфические антитела. Теоретическую проверку этого предположения можно сделать на основе закона действующих масс.

Закон действующих масс для рассматриваемой ситуации можно записать в таком виде [уравнение (1)], чтобы при графическом построении зависимости количества связанных антител от общего количества антител в смеси можно было выявить

влияние на связывание аффинности антител и концентрации свободного антигена.

$$[\text{Ат}] = \frac{K\,[\text{Аг}]}{1 + K\,[\text{Аг}]} \cdot [\text{Ат}_{\text{общ}}] \qquad (1)$$

[Ат] — концентрация связанных антител, [$\text{Ат}_{\text{общ}}$] — общая концентрация антител, [Аг] — концентрация антигена.

Если уравнение (1) перевести в логарифмическую форму [уравнение (2)], то точка пересечения графика с осью y будет зависеть как от аффинности антител, так и от концентрации антигена.

$$\lg\,[\text{Ат}] = \lg\,\frac{K\,[\text{Аг}]}{1 + K\,[\text{Аг}]} + \lg\,[\text{Ат}_{\text{общ}}] \qquad (2)$$

Наблюдаемый характер влияния аффинности на титрование по методу ELISA существенно зависит от способа графического представления результатов. К сожалению, результаты титрования часто изображают в полулогарифмических координатах, что лишь усложняет выявление характера влияния аффинности антител. В то же время, если произведение параметра K, отражающего аффинность антител, и концентрации антигена близко к 100 или выше, то отношение $K\,[\text{Аг}]/(1+K[\text{Аг}])$ стремится к единице. Это означает, что в системе практически не будет наблюдаться различий в связывании антител, аффинность которых выше определенного значения, в свою очередь зависящего от концентрации свободного антигена.

Установление характера влияния аффинности может осложняться гетерогенностью антител. Для того чтобы учесть влияние гетерогенности, уравнение (1) модифицируют следующим образом (Lew, 1984):

$$[\text{Ат}] = \frac{K\,[\text{Аг}]^{a}}{1 + K\,[\text{Аг}]^{a}} \cdot [\text{Ат}_{\text{общ}}]$$

Из этого уравнения следует, что при увеличении гетерогенности антител происходит уменьшение влияния аффинности на их связывание. Это означает, что выводы, сделанные при исследовании влияния аффинности на связывание моноклональных антител (Peterfy et al., 1983; Nimmo et al., 1984; Sips, 1948), могут оказаться неверными для гетерогенных систем. Модификация Сипса вообще характеризуется низкой достоверностью (Bruni et al., 1976) и едва ли пригодна для обработки данных ELISA.

Практически влияние аффинности может выражаться в недооценке антител с низкой аффинностью (Butler, 1981; Butler et al., 1978). Утверждалось даже, что это обстоятельство сделает метод вовсе непригодным для количественных определений (Sips, 1948). Все же имеющихся на сегодня данных явно недос-

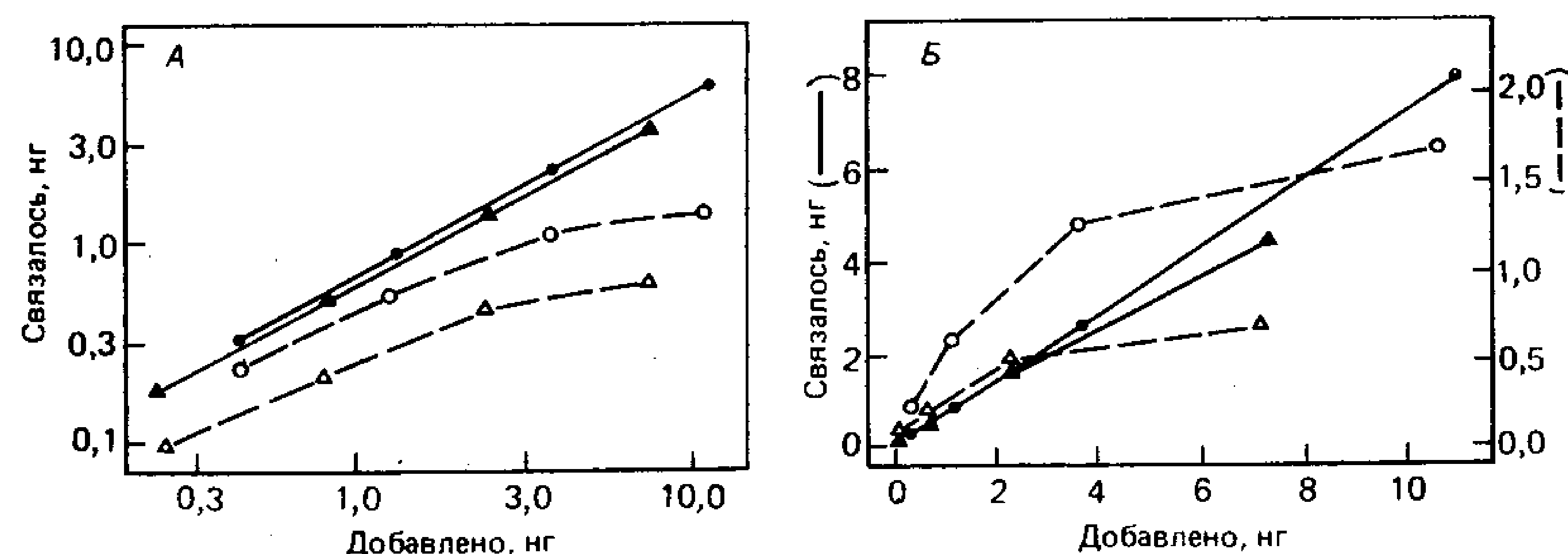


Рис. 14-11. Соотношение между кривыми связывания антител, значениями аффинности антител и количествами антигена, использованными для покрытия поверхности лунок в плате для микротитрования. Как в логарифмических (*А*), так и в линейных (*Б*) координатах не обнаруживается заметных различий в связывании антител высокой (темные и светлые кружки, $K_a \simeq 2 \cdot 10^{10}$ л/моль) и умеренной (темные и светлые треугольники, $K_a \simeq 3 \cdot 10^7$ л/моль) аффинности с поверхностью, обработка которой проводилась в присутствии 100 нг антигена на лунку (сплошные линии). В логарифмических координатах наблюдаются различия между антителами с высокой и умеренной аффинностью, проявляющиеся в различных положениях точек пересечения кривых с осью *y*, при использовании для обработки меньших количеств антигена (10 нг на лунку; прерывистые линии). В линейных координатах эти различия проявляются в разных значениях угла наклона линейных участков кривых.

таточно для того, чтобы отказаться от использования ELISA в качестве метода оценки содержания специфических антител.

2. Свидетельства влияния аффинности антител на результаты титрования. В целом ряде работ по использованию ELISA для определения специфических антител были отмечены явления, интерпретируемые как результат влияния аффинности (Butler et al., 1978; Lehtonen, Eerola, 1982; Peterfy et al., 1983; Nimmo et al., 1984). Предварительные результаты исследования, представленные на рис. 14-11, *А* и *Б*, позволяют выявить влияние аффинности при сопоставлении кривых титрования, построенных в обычных и в логарифмических координатах. Эти результаты соответствуют предсказаниям, которые можно сделать на основе уравнений (1) и (2). Факт влияния аффинности можно считать установленным в опытах только с гомогенными антителами (рис. 14-11). Обычно при поликлональном иммунном ответе характер влияния аффинности для смешанных популяций антител требует дополнительной проверки.

3. Влияние поливалентности. При работе с антителами из сыворотки быка против альбумина человека были получены данные, позволяющие предположить, что преимущественная регистрация IgM при малых разведениях сыворотки объясняется их поливалентностью и соответственно высокой авидностью (Butler et al., 1980a). Для проверки этого предположения мы

провели очистку мономерных и димерных МОРС 315 (моноклональных антител с одинаковыми значениями K_a) и сравнили их способность связываться с адсорбированной в лунках платы ДНФ-желатиной. При проведении опытов с образцами тех и других антител по отдельности мы не обнаружили никаких различий в способности мономеров и димеров связываться с ДНФ-группами и в возможности регистрации каждого из них с помощью a-ELISA после 24-часовой инкубации. Оказалось, однако, что для ингибирования связывания димерных МОРС 315 требуется в 10 раз более высокая концентрация ДНФ-глицина (свободного гаптена), чем в случае мономеров МОРС 315 (Koertge, Butler, 1985). Более того, скорость образования прочного комплекса с антигеном для мономеров значительно ниже, чем для димеров (Koertge, 1984). Более высокая авидность и скорость образования стабильных связей, характерные для димерной формы, могут приводить к ее избирательному связыванию в условиях недостатка антигена и не будут сказываться при наличии избытка доступного для связывания антигена.

В. Регистрация и обработка результатов анализа

1. *Аппаратура.* Одно из важнейших преимуществ микроварианта метода ELISA заключается в возможности его автоматизации. В настоящее время доступны приборы для автоматического сканирования плат, выпускаемые тремя основными фирмами. Это MP 600 фирмы Dynatech, «Multiscan» фирмы Flow и EL 310 фирмы Biotek. Приборы такого класса способны считывать и регистрировать поглощения во всех 96 лунках платы за время ~60 с. Каждый из таких сканирующих приборов легко соединить с компьютером, который может управлять процессом сканирования, регистрировать и анализировать полученные данные. Для этих целей часто используют системы типа Apple или IBM. Например, компьютер IBM-PCjr при относительно невысокой стоимости и компактности обладает достаточной мощностью для эффективного контроля, сбора и анализа данных.

2. *Компьютерные программы для анализа данных.* Многие фирмы, выпускающие оборудование для анализа, в частности и сканирующих устройств для ИФА в платах, поставляют также упрощенные программы для обработки результатов. В большинстве случаев эти программы не позволяют учитывать иммунохимические особенности метода ELISA, а также сравнивать кривые титрования стандартных и исследуемых образцов и, как правило, предназначены лишь для окончательного обсчета данных. В связи с этим мы разработали свою программу анализа данных, основанную на современных представлениях об основах метода ELISA.

Достоверными значениями, рассчитанными на основании определений в точке при одном разведении, будут такие, которые ложатся на кривую, параллельную стандартной кривой титрования. Поскольку кривые титрования могут иметь различную форму в зависимости от аффинности тестируемых антител [см. выше], значения поглощения в линейной области кривой исследуемого образца могут оказаться вне пределов линейной области кривой титрования стандарта. Более того, кривые титрования образца и стандарта могут иметь различные значения наклона их линейных участков. Поэтому применение стандартного линейного регрессионного анализа для расчетов на основе сравнения поглощения в единичном разведении образца с кривой титрования стандарта может приводить к большой ошибке. Мы считаем, что достоверный расчет может быть сделан только при сравнении со стандартной кривой данных, полученных в серии разведений исследуемого образца.

Обработка данных, полученных методом ELISA, и оценка их достоверности должны включать графический и регрессионный анализ результатов титрования множества образцов и стандартов. Для выполнения таких задач мы разработали программу в расчете на компьютер IBM-PC (или PCjr), позволяющую быстро проанализировать данные определения различных разведений образцов и стандарта, размещенных на одной плате (см. рис. 14-5, *Б*). В программу включено осуществление следующих функций:

1. Регистрация значений поглощения в лунках, которые получают через интерфейс от сканирующего детектора.

2. Перегруппировка данных в формат, удобный для их обработки с учетом соответствующих разведений, на основании сохраняемого в памяти стандартного шаблона (например, показанного на рис. 14-5, *Б*) или на основании вводимой дополнительной информации о распределении образцов на данной плате.

3. Построение кривой титрования стандарта, на которой оператор может выбрать линейную область.

4. Линейный регрессионный анализ линейной области стандартной кривой и выведение соответствующего уравнения для последующей обработки данных анализа исследуемых образцов.

5. Обсчет данных для исследуемых образцов на основании выведенного уравнения. В первую очередь рассчитывается разведение стандарта, соответствующее значению поглощения, характерному для данного разведения исследуемого образца. Затем на основании заданного реального разведения образца рассчитывается искомая концентрация неразбавленного образца.

6. Сравнение значений, полученных для серии разведений каждого образца, за исключением значений, рассчитанных на основании поглощений, выходящих за рамки диапазона линейности стандартной кривой.

7. Выбор оператором таких последовательных разведений каждого образца, которые соответствуют близким между собой расчетным значениям (в ед/мл) (т. е. тех, которые фактически попадают в область кривой титрования образца с тем же наклоном, что и у стандартной кривой). Среднее значение, рассчитанное на основании данных по отобранным разведениям, дает наиболее достоверную оценку концентрации антител в образцах.

8. Оценка оператором отобранных данных с помощью линейного регрессионного анализа для проверки линейности участков кривых титрования образцов, а также их параллельности соответствующим участкам кривой титрования стандарта.

Вышеприведенная пропись помогает максимально увеличить достоверность данных, получаемых с помощью ELISA, но не позволяет избежать ошибки в оценке концентрации стандарта. Кроме того, используемый подход к анализу данных основан на допущении, что количество связываемых антител пропорционально их концентрации и не зависит от их аффинности.

Г. Определение абсолютных количеств специфических антител

1. *Обзор современных подходов.* Для измерения абсолютных количеств антител было предложено по меньшей мере четыре различных метода. С применением каждого из этих методов связаны определенные теоретические и (или) практические проблемы. *Метод сравнения со стандартом* основан на использовании стандартной сыворотки (содержание антител в ней установлено по независимым критериям), с которой сопоставляют содержание соответствующих антител в исследуемых образцах. Этот метод дает достоверные результаты, только если значения аффинности антител в сыворотке и в стандарте находятся в диапазоне, для которого связывание не зависит от аффинности (см. выше). Величина ошибки, которая привносится из-за такого допущения, была выявлена в цитировавшихся ранее специальных исследованиях (Butler et al., 1978). При использовании мультивалентных антигенов важно, чтобы антитела образца и стандарта обладали одинаковой специфичностью. Так называемый *прямой метод ELISA*[1], основанный на исполь-

---

[1] Этот термин (англ. direct-ELISA method) взят из арсенала лабораторного жаргона. Под ним подразумевают вариант ИФА, основанный на применении в качестве стандарта адсорбированных на пластике Ig из того же источника и того же изотипа, что и исследуемые первичные антитела. Этот метод точнее было бы назвать методом Ig-стандарта.

зовании очищенных Ig, адсорбированных на пластиковой подложке, в качестве стандарта для первичных антител, также связан с весьма рискованным допущением. Предполагают, что узнавание адсорбированных Ig изотип-специфическими анти-Ig происходит так же, как и при узнавании первичных антител того же изотипа, связанных с антигеном. Последние данные, полученные в нашей лаборатории, показывают, что это предположение несостоятельно. Антитела, связанные с антигеном, узнаются соответствующими анти-Ig гораздо эффективней, чем иммуноглобулины того же изотипа, адсорбированные на пластике (Dierks, 1985). Третий подход к количественному анализу основан на ингибировании изотип-специфических иммуноглобулинов очищенными Ig того же изотипа. Это так называемый метод *антиглобулинового ингибирования.* Технические трудности, связанные с его применением, обусловлены тем, что: а) очищенные Ig в растворе конкурируют с антиглобулинами иначе, чем антитела того же изотипа, связанные с антигеном, и б) в ходе ингибирования образуются осложняющие ситуацию растворимые комплексы. Для преодоления этих трудностей и корректного учета вклада различных факторов необходимо располагать дополнительным стандартом, по которому можно было бы оценить эффективность работы самого *метода сравнения со стандартом.*

Наконец был предложен и опробован *метод количественной оценки по стехиометрии взаимодействия.* Теоретически невозможность установления надежной корреляции между количеством связанных первичных антител и связанного фермента в режиме a-ELISA (см. рис. 14-9) порождает сомнения в перспективности использования такого подхода. И все же метод можно использовать при наличии конъюгатов, стабильных и однородных по размеру, применение которых благодаря значительно меньшим пространственным затруднениям обеспечивало бы надежную количественную зависимость между активностью индикаторного фермента и числом связавшихся первичных антител (см. рис. 14-10).

Важнейший вопрос, имеющий непосредственное отношение к любым методам количественной оценки, но не получивший пока удовлетворительного разрешения, заключается в том, связываются ли при проведении анализа методом ELISA все или почти все специфические антитела, содержащиеся в тестируемом образце? Представленный выше теоретический анализ предсказывает, что степень связывания антител в линейной области зависит от их аффинности, так что оценка общего содержания антител в сыворотке, включающей главным образом антитела с низкой аффинностью, может оказаться существенно заниженной.

При работе с гомогенными антителами к ДНФ-группе, обладающими $K_a > 10^7$, мы действительно наблюдали максимальную степень связывания в линейной области, правда, лишь после 24-часовой, а не 1-часовой инкубации (Koertge, Butler, 1985). Максимальную степень связывания определяли как количество антител МОРС 315, способных связаться с неограниченным избытком препарата ДНФ-*E. coli.* Таким образом, при достаточно длительной инкубации максимальное связывание антигаптеновых антител с высокой аффинностью с адсорбированным на твердой фазе гаптеном оказывается вполне достижимым. Соответствующие данные об антителах с низкой аффинностью, специфичных к белковым антигенам, и о влиянии на их связывание популяционной гетерогенности пока отсутствуют. Следует учитывать, что даже если бы был разработан метод достоверного количественного определения связанных антител, все же потребовались бы дополнительные данные о том, в какой степени количество связавшихся антител отражает общее содержание в образце антител данного изотипа.

V. Другие применения метода a-ELISA

А. Анализ распределения антигена на основе метода ELISA

1. *Теоретические предпосылки.* Анализ распределения антигена (Butler, 1981) возник благодаря проводившимся исследованиям взаимодействия белков с пластиковой подложкой, с помощью которых была обнаружена область независимого связывания (Cantarero et al., 1980). В этой области наблюдается линейная зависимость между количеством добавленного и количеством связывающегося антигена, т. е. наблюдаемая степень связывания антигена остается постоянной. Реальная величина константы связывания зависит от свойств данного белка и пластиковой подложки. Степень связывания для полистирола Sarstedt варьирует от 20 до 80%, но для большинства белков находится в диапазоне 40—50%. В системе микротитрования с использованием Immulon 2 область независимого связывания для большинства белков распространяется вплоть до загрузки 100 нг на лунку при объеме образца 200 мкл. В области независимого связывания отсутствует конкуренция между компонентами добавленной смеси антигенов за центры связывания. После инкубации и удаления несвязавшихся белков все белки, присутствовавшие в растворе, в равной степени должны быть представлены на поверхности пластика (Cantarero et al., 1980). Последующая идентификация присутствующих антигенов может быть осуществлена в системе регистрации a-ELISA с использованием соответствующих антиген-специфических антител. Данный метод анализа нельзя использовать для количествен-

ного определения антигена в исходном образце, поскольку: а) степень связывания данного компонента смеси белковых антигенов, как правило, неизвестна и б) степень адсорбции подвержена день ото дня колебаниям на величину до 10—20%.

2. *Применение анализа распределения антигена.* Этот анализ можно успешно использовать для определения с высокой чувствительностью распределения антигена в ходе биохимического фракционирования, например во фракциях после центрифугирования в сахарозном градиенте, обычной или высокоэффективной хроматографии или элюции из полиакриламидных гелей (Butler, 1981, 1985; Butler et al., 1980a, b; Pringnitz et al., 1985a, b; Pringnitz, Butler, 1985). Такой анализ является вполне адекватным в тех случаях, когда есть необходимость сравнить относительное содержание антигена в различных фракциях. Нормировать результаты анализа можно по отношению активности индикаторного фермента к общему содержанию белка в образце, например A_{405}/мкг белка. Как и в исходном варианте ELISA, метод распределения антигена позволяет зарегистрировать <0,5 нг связанного антигена при хорошем отношении сигнала к фону. Весьма удобно использовать его в сочетании с ВЭЖХ белков, когда концентрация белка во фракциях очень мала, но известна благодаря применению чувствительных детекторов. Этот метод эффективно используется для оценки специфичности антисыворотки, с которой планируют в дальнейшем работать непосредственно в методе ELISA. Так, данные, представленные в табл. 14-3, с точки зрения техники их получения являются данными анализа распределения антигена.

3. *Возможные трудности.* При работе с методом распределения антигенов мы столкнулись с тремя проблемами, о которых следует знать тому, кто собирается этот метод использовать. Во-первых, если во фракции содержится более чем 90 % одного антигена, например IgG1, оценка его содержания, полученная с помощью данного метода, может оказаться заниженной. В то же время сильное разведение такого образца осложнит определение в нем минорных антигенов. Кроме того, нормирование данных, полученных при совершенно разных разведениях, само по себе может представлять значительные трудности. Во-вторых, если при выделении белкового антигена применяли детергенты, например при работе с мембранными белками, их следует удалить для обеспечения связывания белков с пластиком. Этого достигают, например, центрифугированием содержащего детергент экстракта в сахарозном градиенте (Pringnitz, Butler, 1985; Pringnitz et al., 1985b). И наконец, возникают проблемы, связанные с вариациями в степени адсорбции на пластике, а в режиме микротитрования — с очень существенными различиями в сорбционной способности плат, выпущенных различными фирмами, и с различиями между отдельными лунками на одной

и той же плате. Характерно, что собственно в методе ELISA, используемом для определения антиген-специфических антител в условиях, когда антиген добавляется в избытке и непосредственно не тестируется, различия между платами и лунками, обнаруживаемые при проведении анализа распределения антигена, не выявляются. Причина этого заключается в том, что в методе ELISA вариации во взаимодействии белков с пластиком, иначе говоря количества адсорбированных антиглобулинов, представляют собой лишь второстепенный фактор.

Б. Конкурентный иммуноферментный анализ

1. *Схема непрямого конкурентного анализа.* Вариант ИФА, предложенный в работе (Yorde et al., 1976), представляет собой непрямой конкурентный метод количественной оценки содержания антигена. Согласно определению непрямого конкурентного метода (Yorde et al., 1976), он основан на количественном измерении избытка свободных антител, остающихся в системе после добавления образца, содержащего неизвестное количество антигена, и этим отличается от прямых методов, которые основаны на непосредственном измерении содержания антигена (Engvall et al., 1971). Непрямые методы анализа выгодно использовать, когда: а) антигены одновалентны, как в случае гаптенов, и не удается применить обычный сэндвич-анализ, б) индикаторный компонент, например фермент, характеризуется настолько большими размерами или существенной гетерогенностью, что при присоединении его к антигену и использовании для прямого конкурентного анализа истинная эквивалентная конкуренция между свободным и содержащим ферментную метку антигенами оказывается невозможной.

2. *Применение непрямого конкурентного анализа.* Данный метод исходно был предложен для определения хориогонадотропина человека (ХГТЧ), но нам удалось успешно применить его и для тестирования β_2-микроглобулина — секреторного компонента и мембранного белка BAMP (Pringnitz et al., 1985a, b).

Метод непрямого конкурентного анализа является вполне функциональным, хотя и весьма громоздким вследствие значительного числа этапов, составляющих процесс детектирования в a-ELISA. В лабораториях, где работают с a-ELISA, целесообразно использовать этот метод для предварительного изучения принципиальных возможностей применения непрямого ИФА для тестирования данного антигена, поскольку для этого не потребуется приготовления каких-либо новых реагентов. Для последующей рутинной работы предпочтительно использовать конъюгат фермента с антителами к тестируемому антигену.

Краткое содержание

Показано, что a-ELISA является чувствительным и надежным методом определения антиген-специфических антител. Благодаря таким факторам, как стабильность растворимого иммуноферментного комплекса и легкость его приготовления, устойчивость фермента к денатурации, простота приспособления метода для тестирования различных веществ (требуется смена лишь одного из компонентов системы), метод a-ELISA в нашей лаборатории получил весьма широкое применение для определения специфических антител. Успешное использование принципов a-ELISA для изучения распределения антигена, для непрямого конкурентного анализа антигенов, а в последнее время и для изучения иммунохимии и стереохимии самого метода ELISA создало этому методу репутацию весьма полезной иммунологической «рабочей лошадки». Однако по сути дела a-ELISA — всего лишь еще одна система детектирования. Все сложные вопросы, связанные с влиянием аффинности и авидности антител на эффективность их количественного определения, по-прежнему требуют дальнейшего изучения.

Литература

Axen R., Vretblad P., 1971. Chemical fixation of proteins to water-insoluble carriers. In: Protides of the Biological Fluids, H. Peeters, ed., Pergamon Press, Oxford, Vol. 18.
Avrameas S. A., Gilbert B. (1972). Enzyme-immunoassay for the measurement of anyigens using peroxidase conjugates, Biochimie, 54, 837.
Bruni C., Germani A., Koch G., Strom R. (1976). Derivation of antibody distribution from experimental binding data, J. Theor. Biol., **61**, 143.
Butler J. E., 1981. The amplified ELISA: Principles and applications for the comparative quantitation of class and subclass antibodies and the distribution of antibodies and antigens in biochemical separates, Methods in Enzymology, Immunochemical Methods, H. J. Vunakis and J. J. Lagone, eds., Vol. 73.
Butler J. E., Feldbush T. L., McGivern P. L., Stewart N. (1978a). The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): A measure of antibody concentration or affinity? Immunochemistry, **15**, 131.
Butler J. E., McGivern P. L., Swanson P. (1978b). Amplification of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the detection of class-specific antibodies, J. Immunol. Methods, **20**, 365.
Butler J. E., McGivern P. L., 1985 (Submitted). The measurement of IgE and other classes of antibodies in the sera and bronchial lavage fluids of patients to Alternaria, house dust and ragweed.
Butler J. E., McGivern P. L., Cantarero L. A., Peterson L. (1980a). Application of the amplified enzyme-linked immunosorbent assay: Comparative quatitation of bovine serum IgG1, IgG2, IgA and IgM antibodies, Am. J. Vet. Res., **41**, 1479.
Butler J. E., Peterson L., McGivern P. L. (1980b). A reliable method for the preparation of bovine secretory immunoglobulin A (SIgA) which circumvents problems posed by IgGI dimers in colostrum, Mol. Immunol., **17**, 757.
Cantarero L., Butler J. E., Osborne J. W. (1980). The binding characteristics of six proteins to polystirene and its implications to solid-phase immunoassay using polystyrene tubes, Analy. Biochem., **105**, 375.

Cuatrecasas P., Anfinsen C. B. (1971). Affinity chromatography, Annual Rev. Biochem., **40**, 259.
Dierks S. E., 1985. Absolute quantitation of IgG and IgA antiprotein and antihapten antibodies using a microELISA system, M. S., Thesis, University of Iowa.
Engvall E., Jonsson K., Perlmann P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme labelled antigen and antibody coated tubes, Biochem. Biophys. Acta, **251**, 472.
Engvall E., Perlmann P. (1972). Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes, J. Immunol., **109**, 129.
Koertge T. E., 1984. A study of the quantitative capability of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with regard to the use of specific antibodies to study the transport of monomeric and polymeric antibodies, Ph. D. Thesis, University of Iowa.
Koertge T. E., Butler J. E., 1985 (Submitted). The relationship between the binding of primary antibody to solid-phase antigen in microtiter plates and its detection by the ELISA, J. Immunol. Methods.
Koertge T. E., Butler J. E., Dierks S. E., 1985 (Submitted). Evaluation of the soluble immune complex (EIC) of the amplified enzyme-linked immunosorbent assay (a-ELISA) and the use of this assay for quantitation by reaction stoichiometry.
Lehtonen O.-P., Eerola E. (1982). The effect of different antibody affinities on ELISA absorbance and liter, J. Immunol. Methods, **54**, 233.
Lew A. M. (1984). The effect of epitope density and antibody affinity on the ELISA as analyzed by monoclonal antibodies, J. Immunol. Methods, **72**, 171.
Nimmo G. R., Lew A. M., Stanley C. M., Steward M. W. (1984). Influence of antibody affinity on the performance of different antibody assays, J. Immunol., **72**, 177.
Peterfy F., Kunsela P., Makela O. (1983). Affinity requirements for antibody assays mapped by monoclonal antibodies, J. Immunol., **130**, 1809.
Peterman J. H., 1985. Bovine-associated mucoprotein (BAMP). III. De novo synthesis by non-mammary tissues, J. Dairy Sci.
Pringnitz D. J., Butler J. E., 1985. Bovine-associated mucoprotein. (BAMP). III. De novo synthesis by no-mammary tissues., J. Dairy Sci. (in press).
Pringnitz D. J., Butler J. E., Guidry A. J., 1985a. In novo proteolytic activity of the mammary gland. Contribution to the origin of secretory component, β_2-microglobulin and bovine-associated mucoprotein (BAMP) in cows milk, Vet. Immunol. Immunopath. (in press).
Pringnitz D. J., Butler J. E., Guidry A. J., 1985b. Quantitation of bovine β_2-microglobulin: Occurrence in body fluids, on milk fat globules and origin in milk, Mol. Immunol. (in press).
Sips R. (1948). On the structure of the catalyst surface, J. Chem. Phys., **16**, 490.
Sloan G. J., 1975. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Application to the quantitation by subclass of bovine antibodies against Staphylococcus aureus, M. S. Thesis, University of Iowa.
Yorde D. E., Sasse E. A., Wang T. Y., Hussa R. O., Garancis J. C. (1976). Competitive enzyme-linked immunoassay with use of a soluble enzyme/antibody immune complex for labeling. I. Measurement of human choriogonadotropin, Clin. Chem., **22**, 1372.
Zeiss C. R., Pruzansky J. J., Patterson R., Roberts M. (1973). A solid phase radioimmunoassay for the quantitation of human reaginic antibody against ragweed antigen E, J. Immunol., **110**, 414.

Глава 15

Ферментативный иммунометрический анализ с применением аффинных колонок

Дж. Уильям Фрейтаг

Введение

Иммунометрическим анализом называют такой вариант иммунологического анализа, при котором роль количественно определяемого компонента играют меченые антитела. Это отличает его от конкурентных радиоиммунологического или иммуноферментного вариантов анализа, проведение которых основано на использовании меченых антигенов, конкурирующих с тестируемым антигеном за ограниченное число центров связывания антител. Антитела метят с помощью радиоизотопов, ферментов, флуорофоров, люминофоров или каким-либо иным способом, позволяющим в конечном итоге зарегистрировать сигнал, хотя бы и опосредованно, через некую сложную систему промежуточных звеньев. Описаны две существенно различающиеся схемы проведения иммунометрического анализа — одноцентровый анализ и двухцентровый (или сэндвич-анализ).

Первые попытки осуществления одноцентрового иммунометрического анализа восходят практически ко времени зарождения РИА. Тем не менее серьезное развитие метод получил лишь к 1971 г. одновременно с первыми разработками принципов иммуносорбционного анализа (ELISA) в двух независимых группах исследователей (Schuurs, Van Weeman, 1971; Engvall, Perlmann, 1971). В основе одноцентрового иммунометрического анализа, так же как и позже разработанных вариантов с использованием для усиления сигнала вторых антииммуноглобулиновых антител, белка А или системы авидин/биотин (Porstmann et al., 1982; Holbeck et al., 1983; Yolken et al., 1983), лежит одна и та же принципиальная схема, согласно которой тестируемый антиген конкурентно ингибирует связывание меченых антител с антигеном, адсорбированным на подложке.

Такая схема анализа вполне пригодна для тестирования антигенов любого размера (как гаптенов, так и крупных белков), она широко применяется в научных исследованиях и клинической диагностике. Тем не менее ей присущи и некоторые принципиальные недостатки. Один из них — это предел чувствительности определения, непосредственно связанный с принципом конкуренции. При конкурентном анализе невозможно использовать большой молярный избыток меченых антител по отношению к количеству тестируемого антигена, поскольку это привело бы к значительному снижению отношения интенсивностей сигналов в опыте и в контроле.

Двухцентровый (сэндвич-) метод анализа в весьма примитивном варианте был впервые описан в работе (Habermann, 1970), а в полностью завершенном виде — в публикациях (Maiolini, Masseyeff, 1975; Ling, 1975). В варианте, предложенном в работе (Maiolini, Masseyeff, 1975), тестируемый антиген (α-фетопротеин) сначала адсорбировали инкубацией с избытком специфических антител, иммобилизованных на твердом носителе. После непродолжительной отмывки добавляли избыток (по отношению к количеству антигена) антител, конъюгированных с ферментом. После дополнительной отмывки, удаляющей избыток несвязавшегося конъюгата, определяли количество конъюгированных антител в составе «сэндвича» [меченые антитела — антиген — немеченые антитела — носитель].

Данная схема анализа впоследствии подвергалась многочисленным модификациям, включая изменения в порядке добавления реагентов и даже введение в систему двух (Porstmann et al., 1982) или трех (Nomura et al., 1983) моноклональных антител, узнающих различные эпитопы на молекуле антигена. Последний подход позволяет добавлять реагенты одновременно и тем самым уменьшать число стадий отмывки. В конце концов стало очевидно, что двухцентровый иммунометрический анализ является наиболее чувствительным и надежным из всего арсенала методов иммунологического тестирования. С его помощью удается количественно определять до одного аттомоля (10^{-18} моль) антигена (Ishikawa et al., 1982). В качестве серьезного недостатка этого метода следует отметить обязательное требование к размеру антигена, который должен быть достаточно велик, чтобы нести не менее двух различных центров связывания антител (эпитопов). Это требование накладывает ограничения на применение метода для целого ряда важных клинических тестов. В то же время бесконкурентный характер анализа, позволяющий работать с избытками реагентов, обеспечивает высокую чувствительность при решении широкого круга задач.

Основы иммунометрического анализа с применением аффинных колонок

Описанный недавно новый вариант иммунометрического анализа (Freytag et al., 1984) с применением аффинных колонок (ИААК) сочетает преимущества бесконкурентного принципа сэндвич-анализа с требованием наличия у антигена лишь одного центра связывания, как в одноцентровом варианте анализа. Сочетание этих двух принципов позволило создать очень чувствительную и высокоуниверсальную систему иммунотестирования. В рассматриваемом методе анализа (рис. 15-1) избыток меченых (ферментом) моновалентных антител инкубируют с

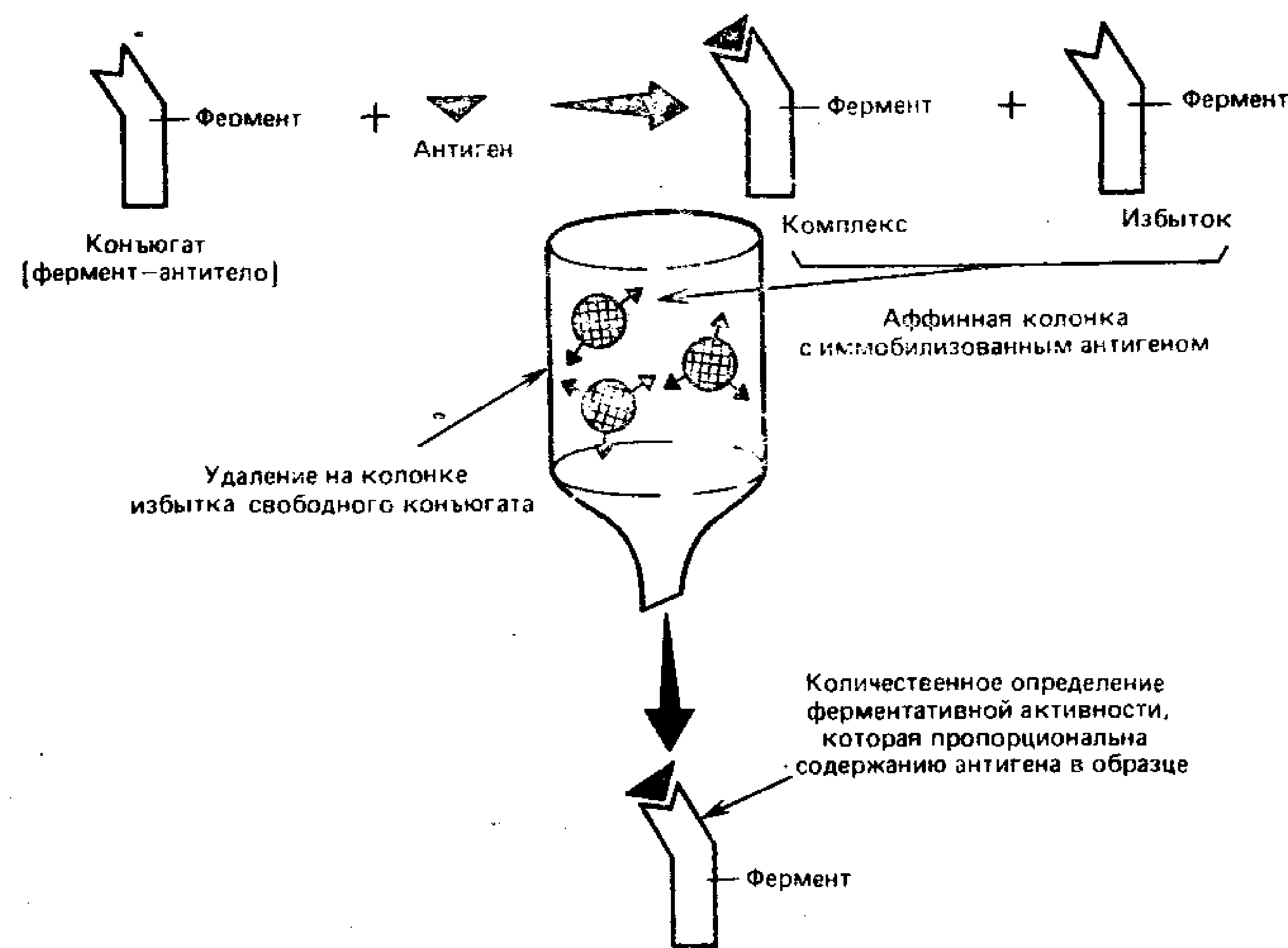


Рис. 15-1. Схема проведения ферментативного иммунометрического анализа с применением аффинных колонок (ИААК).

образцом, содержащим тестируемый антиген. Даже при очень низкой концентрации антигена использование большого избытка антител приводит к тому, что антиген связывается быстро и полностью. Избыток несвязавшихся с антигеном меченых моновалентных антител удаляют из смеси пропусканием через колонку, заполненную аффинным сорбентом — иммобилизованным на пористой матрице антигеном (или его аналогом) в большом избытке (по отношению к количеству антител в образце). Комплекс [моновалентные антитела — антиген] с сорбентом не связывается. В полученном таким образом элюате, не содержащем свободных антител, измеряют содержание метки (активность фермента), которое должно быть прямо пропорционально исходному содержанию антигена в тестируемом образце. Чувствительность этого метода ограничивается лишь чувствительностью системы обнаружения метки и не зависит от аффинности антител. Применение ферментной метки в таком методе весьма выгодно, поскольку для получения достаточно сильного сигнала можно при необходимости использовать продолжительное время инкубации с субстратом. Существенно, что метод ИААК в равной степени пригоден для тестирования как малых, так и больших антигенов.

Постановка эксперимента

Следует подчеркнуть, что использование нативных бивалентных антител или ферментных конъюгатов, в состав которых

входит несколько молекул моновалентных антител, неизбежно ограничивает чувствительность определения до значений, характерных для конкурентных методов. Это обусловлено невозможностью отделения полностью свободных антител от би- или поливалентных антител, у которых хотя бы один из центров связывания остался свободным — и те, и другие будут связываться с сорбентом. В то же время в ряде случаев требования к чувствительности определения антигена таковы, что их вполне удается удовлетворить с использованием немономерных конъюгатов [фермент — моновалентные антитела], особенно при наличии антител с высоким сродством к антигену. В качестве примера можно отметить разработку на основе ИААК чувствительного (нижний предел обнаружения 0,2 нМ) и очень точного (коэффициент вариации меньше 3%) автоматизированного метода определения дигоксина (Leflar et al., 1984). В этом случае для детектирования использовали немономерный конъюгат типа [$F(ab')_2$ — β-галактозидаза].

Вместе с тем в тех случаях, когда требуется бóльшая чувствительность определения, чем та, которая может быть достигнута при работе с данными антителами из-за ограничений, накладываемых величиной константы связывания (которая редко превышает 10^{10} л/моль, а как правило, находится в диапазоне 10^9—10^7 л/моль; Pecht, 1982), необходимо использовать мономерные конъюгаты моновалентных антител. Для получения таких конъюгатов не удается использовать традиционные методики, такие, как одностадийная или двухстадийная пришивка глутаровым альдегидом (Avrameas, 1969; Avrameas, Ternynck, 1971), приводящие к образованию крупных агрегатов. Более подходящими для этих целей являются группо-специфические методы пришивки, основанные на применении гомо- и гетеробифункциональных сшивающих агентов (Ishikawa et al., 1983; Ishikawa et al., 1981). Однако и их нельзя считать полностью адекватными, поскольку они не дают возможности очистить мономерный конъюгат от больших количеств несвязавшихся антител и фермента. Сравнительно недавно в работах группы Ишикава (Imagawa et al., 1984; Hashida et al., 1984) были описаны две новые простые методики получения и очистки мономерных конъюгатов [Fab′ — β-галактозидаза] и [Fab′ — пероксидаза]. Эти методики основаны на использовании $F(ab')_2$-фрагментов, полученных при ограниченном протеолизе пепсином IgG (как правило, IgG, очищенного аффинной хроматографией) и меченных простыми гаптеновыми группами — 2,4-динитрофенильными или флуоресцеиновыми. Необходимо включение лишь ограниченного числа групп — около 3—4 на молекулу. Меченные гаптеном $F(ab')_2$-фрагменты расщепляют избирательным восстановлением межцепочечных дисульфидных связей с образованием моновалентных Fab′-фрагментов со свободными

SH-группами. Их последующее связывание с β-галактозидазой достигается в две стадии с помощью гомобифункционального реагента, *о*-фенилендималеимида, образующего сшивку между свободными SH-группами. При конъюгации с пероксидазой использовали гетеробифункциональный сшивающий агент N-сукцинимидил- 4-(N- малеимидометил)циклогексан- 1-карбоксилат. Стадию пришивки проводят в условиях большого молярного избытка фермента для предотвращения образования конъюгатов, содержащих более одной молекулы Fab′ на молекулу фермента. И наконец, мономерный конъюгат очищают от избытка свободного фермента аффинной хроматографией на колонках с иммобилизованными анти-ДНФ или антифлуоресцеиновыми антителами. Десорбируют конъюгат с колонки в неденатурирующих условиях элюцией свободными гаптенами (2,4-динитрофенолом или флуоресцеином), которые не могут повлиять на иммунологическую или ферментативную активность конъюгата при его последующем использовании. Применяя полученный таким образом мономерный моновалентный конъюгат [Fab′—β-галактозидаза] в анализе IgG человека с помощью ИААК удается определять до 0,1 фмоль (10^{-16}) IgG.

В принципе для получения конъюгата, пригодного для работы в режиме ИААК, можно использовать практически любой фермент, но все же β-галактозидаза обладает рядом неоспоримых преимуществ. Во-первых, этот фермент характеризуется чрезвычайно высокой эффективностью катализа (число оборотов >450 000 мин$^{-1}$) по отношению к простому легко тестируемому хромогенному субстрату *о*-нитрофенил-β-D-галактопиранозиду (коэффициент экстинкции отщепляемого *о*-нитрофенола составляет ~3100 л·моль$^{-1}$·см$^{-1}$). Во-вторых, β-галактозидаза легко доступна, она поставляется целым рядом фирм в виде высокоочищенных препаратов. По нашим наблюдениям наиболее качественный препарат выпускает фирма Boehringer Mannheim. Кроме того, в структуре β-галактозидазы присутствует множество (12—20) свободных сульфгидрильных групп, которые могут быть вовлечены в образование ковалентных связей с молекулами антител без потери ферментативной активности. И наконец, поскольку в режиме ИААК проводятся количественные определения фермента во фракции, не связывающейся с сорбентом, ферменты и(или) ингибиторы, содержащиеся непосредственно в тестируемом образце, теоретически могут оказывать влияние на результаты определения активности индикаторного фермента. В связи с этим при тестировании образцов сыворотки человека использование таких распространенных в ИФА ферментов, как щелочная фосфатаза и пероксидаза, менее целесообразно, чем применение β-галактозидазы, поскольку, судя по всему, в сыворотке не содержится ни аналогов, ни ингибиторов этого фермента.

Таблица 15-1. Кинетика взаимодействия антиген — антитело

Концентрация, моль/л		$t_{90\%}$, с[1])
антитело	антиген	
$1\cdot10^{-8}$	$1\cdot10^{-9}$	25
$1\cdot10^{-9}$	$1\cdot10^{-10}$	245
$1\cdot10^{-8}$	$1\cdot10^{-10}$	23
$1\cdot10^{-10}$	$1\cdot10^{-11}$	2454
$1\cdot10^{-9}$	$1\cdot10^{-11}$	232
$1\cdot10^{-8}$	$1\cdot10^{-11}$	23
$1\cdot10^{-10}$	$1\cdot10^{-12}$	2311
$1\cdot10^{-9}$	$1\cdot10^{-12}$	230
$1\cdot10^{-8}$	$1\cdot10^{-12}$	22

[1]) Величина константы скорости бимолекулярной прямой реакции принята равной $1\cdot10^7$ М$^{-1}$·с$^{-1}$.

Хотя, строго говоря, метод ИААК должен быть отнесен к классу гетерогенных ИФА, этап разделения связанных и свободных реагентов в этом методе осуществляется настолько просто и быстро (особенно при использовании соответствующего оборудования), что позволяет сопоставить его с современными вариантами гомогенного анализа. Время инкубации после добавления к образцу препарата моновалентных антител, конъюгированных с ферментом, определяется главным образом концентрациями антител и антигена, поскольку их взаимодействие в данном случае представляет собой простую обратимую бимолекулярную реакцию, зависящую только от диффузии. В табл. 15-1 представлены результаты расчета скорости взаимодействия антиген — антитело в зависимости от их относительного содержания в реакционной смеси. Единственным допущением при расчетах является величина константы скорости прямой реакции $1\cdot10^7$ л·моль$^{-1}$·с$^{-1}$, выбранная на основании данных, полученных для большинства исследованных систем взаимодействия небольших антигенов с антителами (Pecht, 1982). Из расчетных данных табл. 15-1 следует, что даже для определения тестируемого компонента, концентрация которого не превышает пикомолярного уровня, использование большого избытка конъюгата [фермент — антитело] (на наномолярном уровне) позволяет ожидать быстрого количественного связывания и завершения анализа не более чем за 5—10 мин. Кривая, построенная на основании изучения кинетики связывания дигоксина с мономерным конъюгатом [Fab′—β-галактозидаза] (рис. 15-2), подтверждает справедливость расчетных оценок. Концентрации дигоксина и конъюгата в этих экспериментах составляли 0,2 нМ и 10 нМ соответственно. Как видно на ри-

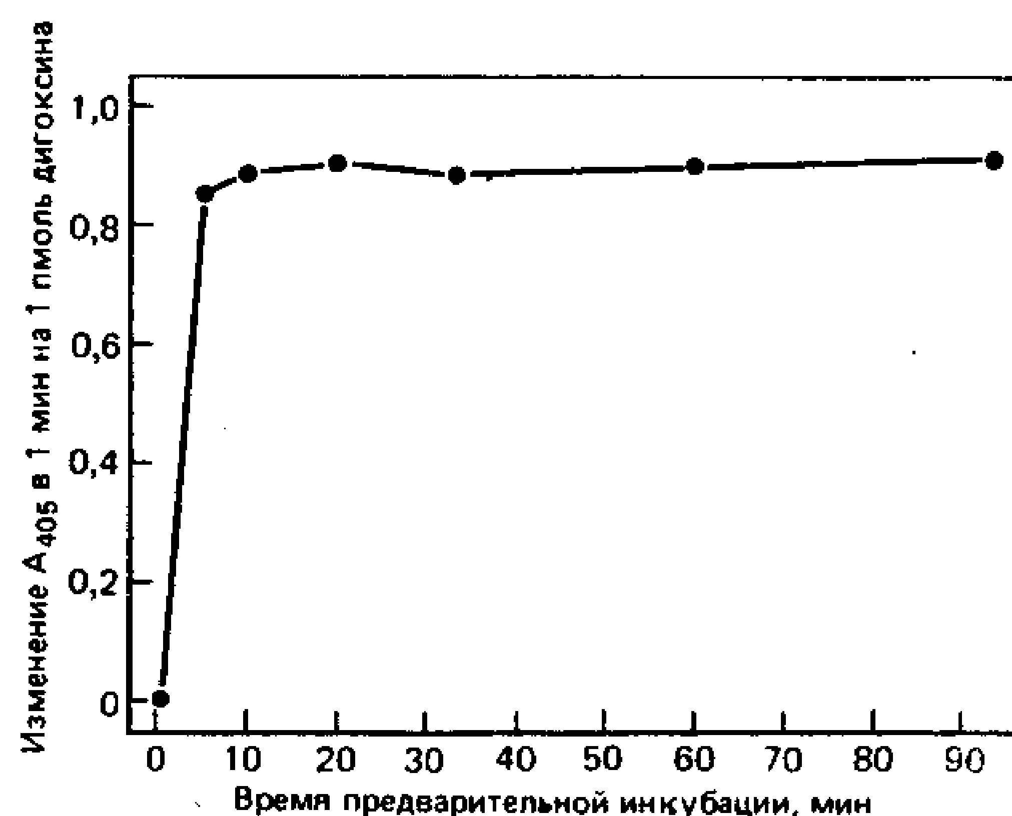


Рис. 15-2. Кинетика связывания дигоксина (0,2 нмоль) с конъюгатом [Fab′ — β-галактозидаза] (~10 нмоль).

сунке, процесс связывания завершался раньше, чем проводилось первое измерение, т. е. быстрее чем за 5 мин.

Сразу после связывания свободного антигена в образце с конъюгатом [антитело — фермент] отделяют избыток конъюгата, не связавшегося с антигеном. Время, необходимое для такого отделения, также зависит главным образом от относительного содержания свободного конъюгата и иммобилизованного на колонке антигена. Если последний представлен в большом избытке, то разделение происходит практически мгновенно. Очень важно, чтобы время разделения было меньше, чем то, за которое могла бы произойти заметная диссоциация комплекса [конъюгат — свободный антиген][1]; оно определяется непосредственно аффинностью антител. Время, за которое комплекс [антиген — антитело] с равновесной константой связывания $1 \cdot 10^{-10}$ л/моль диссоциирует наполовину, составляет около 10 мин.

Известно множество химических методов иммобилизации всевозможных антигенов на различных нерастворимых матрицах (Yarmush, Colton, 1983; Weetall, 1973). Требования, предъявляемые к матрице, используемой для приготовления аффинных колонок в методе ИААК, мало чем отличаются от требований к материалу носителей, используемых в других гетерофазных вариантах ИФА. Могут быть использованы практически любые нерастворимые матрицы с хорошо развитой поверхностью, подобные тем, которые применяются в обычной колоночной хроматографии, т. е. матрицы на основе агарозы, декстранов, пористых и непористых силикагелей, полиакриламида и др. Нам удалось с успехом использовать такие имеющиеся в продаже матрицы, как сефадекс G-10, G-25 и G-50, сефароза 4B и 6B, биогель типа «Biobeads», аффи-гель 10, пористое стекло (CPG), нейлон 66, а также носители типа «Eupergit^R», «Zipax^R» и многие другие. Поскольку в методе ИААК активность фермента определяют во фракции, не связывающейся с

[1] Это привело бы к занижению содержания антигена в образце. — *Прим. ред.*

сорбентом, то отсутствие неспецифической сорбции является хотя и желательным, но не столь важным параметром, как в случае ELISA или сэндвич-анализа. Для иммобилизации антигена могут использоваться традиционные химические приемы: активация бромцианом или окисление периодатом с последующим восстановлением шиффовых оснований боргидридом — для полисахаридных матриц; карбодиимидный метод — для матриц, содержащих свободные карбоксильные или аминогруппы; активация N-гидроксисукцинимидом и др. Однако при разработке тест-систем, предназначенных для широкого практического внедрения, больше внимания следует уделить обеспечению максимальной химической стабильности полученных аффинных сорбентов. В этом аспекте наилучших результатов нам удалось достичь при иммобилизации антигена на сефадексе G-10 методом периодатного окисления/боргидридного восстановления. Хранение такого сорбента в течение года при 4 °C не сопровождалось сколько-нибудь заметным вымыванием (диссоциацией) лиганда. В некоторых случаях полезным оказывается применение белковых или синтетических спейсеров, встраиваемых между матрицей и антигеном. Эффективность использования тех или иных спейсеров требует в каждом случае независимой проверки.

Результаты и их обсуждение

В методе ИААК можно использовать колонки практически любой формы. Имагава и др. (Imagawa et al., 1984) применяли в качестве колонок сменные пластиковые наконечники (типа «Gilson C-200») для автоматического дозатора, которые они заполняли 0,02 мл влажного сорбента (IgG человека, иммобилизованный на сефарозе 4B). В другой работе (Freytag et al., 1984) авторы применяли пластиковые трубки (0,5×8 см) с соответствующими резиновыми пробками, содержащие сорбент типа [сефадекс G-10 — сывороточный альбумин человека — уабаин]. Тех же результатов можно достичь адсорбцией в статическом режиме (без применения колонок), если удастся точно подобрать и поддерживать стандартные условия взаимодействия компонентов реакционной смеси с сорбентом. Однако по нашему опыту наиболее эффективным является анализ с разделением в хроматографическом режиме при условии надежного контроля скорости потока через колонку.

Данные, представленные на рис. 15-3, отражают влияние скорости потока на эффективность анализа. Они были получены для определения дигоксина с использованием мономерного конъюгата [Fab′ — β-галактозидаза] и колонок (0,5×2 см) с аффинным сорбентом [сефадекс G-10 — сывороточный альбумин человека — уабаин] (об использовании уабаина вместо дигок-

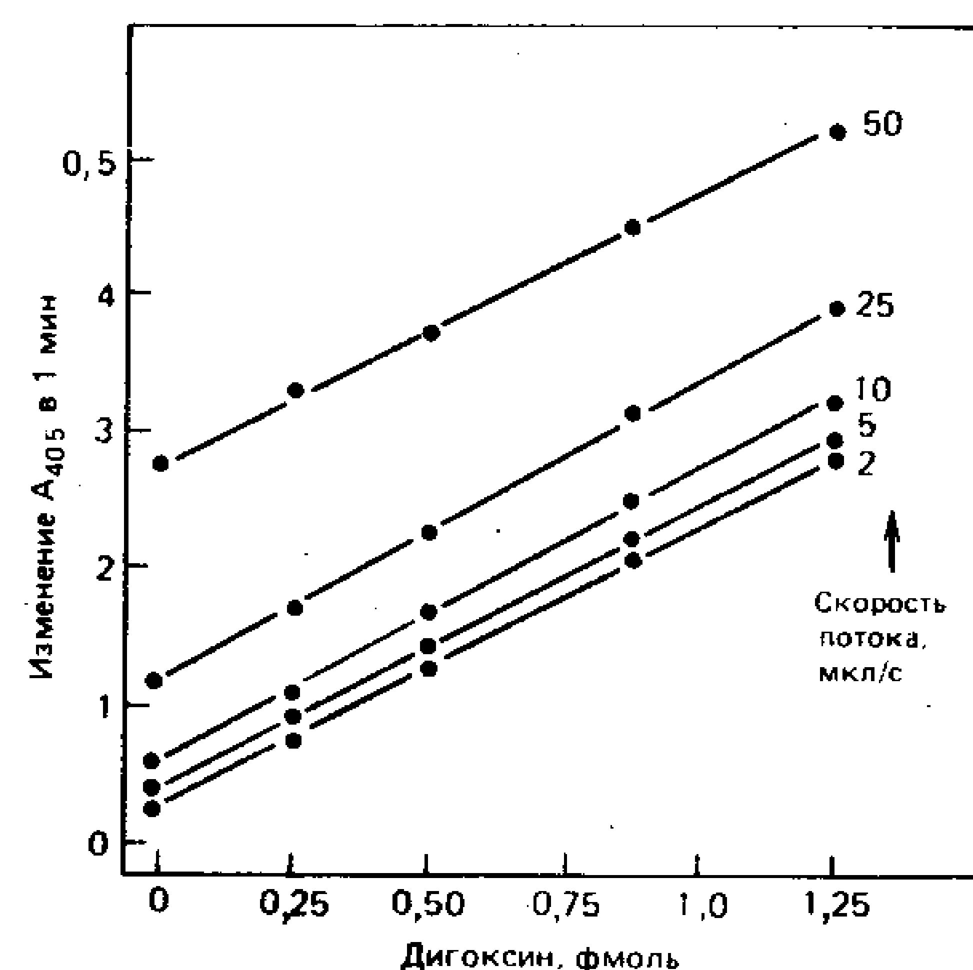


Рис. 15-3. Зависимость эффективности анализа от скорости потока.

сина см. ниже). Скорость потока через колонку контролировали с помощью шприцевого насоса с регулируемой скоростью подачи жидкости. В некоторых пределах скорость потока оказывает заметное влияние только на уровень фоновой активности и практически не сказывается на чувствительности определения. (Фоновая активность определяется как активность фермента в элюате при нулевой концентрации антигена в образце. Теоретически фоновая активность должна равняться нулю. Однако из-за присутствия небольших примесей свободного фермента или иммунологически неактивного конъюгата все же наблюдается фоновая активность, составляющая определенный процент общей ферментативной активности. Считается, что фоновая активность не должна превышать 10% общей активности фермента в пробе.)

Увеличение количества аффинного сорбента практически не сказывается на величине фоновой активности. Это означает, что сорбент уже исходно берется в достаточном избытке. Как нам удалось показать, одну небольшую колонку можно без снижения эффективности разделения использовать для последовательной обработки более 60 образцов, не прибегая к дополнительным промывкам или регенерации между циклами. Повышение фоновой активности при более высоких скоростях потока может быть отчасти скомпенсировано повышением сорбционной емкости колонки.

Аффинный сорбент для метода ИААК может быть получен при иммобилизации на матрице собственно антигена, а также его производного или аналога. Естественно предположить, что наиболее эффективного разделения можно было бы достигнуть при использовании собственно антигена. Однако, как выяснилось на примере системы определения дигоксина, с которой мы уже в течение нескольких лет интенсивно работаем (используя ее и как модельную систему), это не совсем верно. Уабаин представляет собой структурный аналог дигоксина, обладающий несколько бо́льшей растворимостью в воде и на четыре порядка меньшей аффинностью к антидигоксиновым антителам. Сорбенты с иммобилизованными уабаином и дигоксином получали на основе сефадекса G-10 (Pharmacia Fine Chemicals) и носителя аффи-гель-10 (Bio-Rad Labs) с использованием органического

спейсера — триэтилентетраамина — или белкового спейсера — человеческого сывороточного альбумина. Первоначально были подобраны варианты пришивки, позволяющие достичь максимальных включения лиганда и химической стабильности сорбента. Затем оценивали и сравнивали эффективность работы полученных сорбентов с точки зрения чувствительности, точности и величины фона в опытах с несколькими различными конъюгатами, в частности с использованием моновалентного конъюгата [Fab′ — β-галактозидаза]. Наиболее эффективным по всем параметрам оказался сорбент с иммобилизованным уабаином.

Мы не можем с уверенностью сказать, в чем причина более высокой эффективности уабаинсодержащего сорбента по сравнению с дигоксинсодержащим. Теоретически можно было бы ожидать более высокой эффективности от аффинной колонки, полученной на базе самого антигена (или гаптена), а не его аналога, особенно такого, для которого константа связывания с антителами более чем в 10 000 раз ниже, чем константа связывания антигена. Такое представление основано на предположении, что на колонке будет сорбироваться только избыток свободных меченых антител, не связавшихся с молекулами свободного антигена в тестируемом образце. При скорости потока через колонку 34 мкл/с время пребывания комплекса [антиген — антитело] в контакте с сорбентом составляет лишь 17 с. По сравнению с константой первого порядка скорости диссоциации такого комплекса, составляющей $\sim 2 \cdot 10^{-3}$ $с^{-1}$, это время сравнительно мало. (Константа связывания антител с дигоксином, определенная методом равновесного связывания, составляет $5 \cdot 10^{9}$ л·моль$^{-1}$.) В настоящее время мы исследуем возможности применения аналогичного подхода для определения других антигенов. Это могло бы оказаться весьма удобным для создания систем диагностического тестирования антигенов, которые доступны лишь в очень ограниченных количествах или с трудом поддаются очистке, таких, как малодоступные белковые антигены типа полипептидных гормонов или раковых опухолевых маркеров. В подобных случаях для иммобилизации вместо чистого (или частично очищенного) антигена можно было бы использовать синтетический пептидный фрагмент, полученный с помощью автоматического пептидного синтеза или методов молекулярного клонирования. Такие фрагменты могли бы выступать в роли относительно недорогих аналогов антигена для получения аффинного сорбента.

Мы разработали основанные на принципе ИААК системы тестирования целого ряда антигенов, таких, как дигоксин, витамин B_{12}, хориогонадотропин человека (ХГТЧ), IgG, ферритин и некоторые другие. Значения молекулярной массы тестируемых антигенов имеют диапазон от 700 до более чем 500 000.

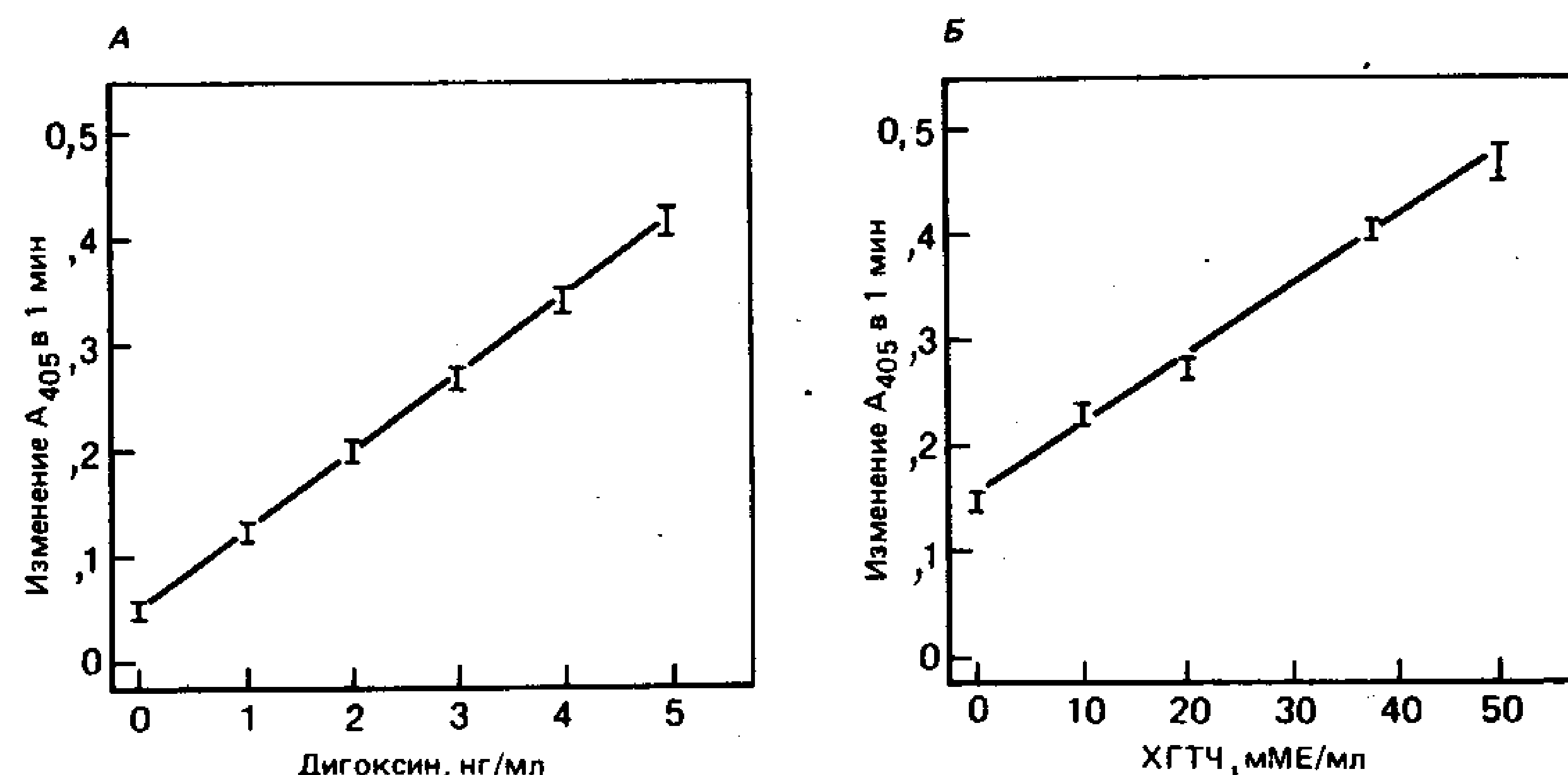


Рис. 15-4. Кривые титрования дигоксина (*А*) и хориогонадотропина человека (*Б*).

Кроме того, реальная концентрация этих антигенов в анализируемых препаратах также варьирует в диапазоне нескольких порядков. На рис. 15-4, *А* и *Б*, показаны кривые титрования дигоксина и ХГТЧ, полученные с помощью метода ИААК.

В случае определения дигоксина образец (20 мкл) инкубировали с мономерным конъюгатом [Fab′ — β-галактозидаза] (20 мкл раствора) в течение 10 мин. Смесь наносили на колонку, содержащую 320 мкл аффинного сорбента уабаин — ЧСА — сефадекс и элюировали со скоростью 5 мкл/с. В аликвоте, взятой из элюата, определяли β-галактозидазную активность по расщеплению хромогенного субстрата *о*-нитрофенилгалактопиранозида. Активность фермента выражали в единицах изменения оптической плотности при 405 нм за 1 мин. Для определения ХГТЧ к 25 мкл образца добавляли 25 мкл раствора конъюгата [Fab′ — β-галактозидаза], инкубировали 15 мин и пропускали смесь через колонку, содержащую 320 мкл аффинного сорбента на основе пористого стекла (типа «CDI-CPG, Glycophase» производства фирмы Pierce Chemical Co.) с иммобилизованным ХГТЧ. Как и при анализе дигоксина в элюате, определяли β-галактозидазную активность по скорости расщепления субстрата.

Для обоих вариантов анализа кривые титрования являются линейными и позволяют тестировать искомые антигены с чувствительностью, которая подходит для клиники. Более того, время, необходимое для осуществления этих тестов, существенно меньше, чем время, затрачиваемое в описанных на сегодняшний день альтернативных вариантах количественного ИФА.

В заключение следует отметить, что метод ферментативного иммунометрического анализа с применением аффинных колонок представляет собой один из подходов к развитию иммунологических методов, обеспечивающий достаточно высокую чувствительность для измерения малых количеств антигена. Чувствительность определения при работе с этим методом практически не зависит от аффинности используемых антител. Было показано, что она может достигать уровня, позволяющего количественно определять 0,1 фмоль искомого компонента. Помимо этого метод ИААК характеризуется чрезвычайной быстротой: он включает лишь стадию кратковременной инкубации с последующим быстрым хроматографическим разделением смеси, причем обе эти стадии легко поддаются автоматизации. Метод ИААК может быть использован для определения антигенов любых размеров, содержащих как один, так и множество эпитопов. Для обеспечения высокой активности анализа необходимо получение двух основных компонентов: мономерного моновалентного конъюгата [антитело — фермент] и стабильного аффинного сорбента с иммобилизованным антигеном. Применение недавно разработанного нами способа синтеза значительно упростило процесс получения первого из двух названных компонентов.

Литература

Avrameas S. (1969). Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugate for the detection of antigens and antibodies, Immunochemistry, **6**, 43—52.
Avrameas S., Ternynck T. (1971). Peroxidase labeled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration, Immunochemistry, **8**, 1175—1179.
Engvall E., Perlmann P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G, Immunochemistry, **8**, 871—874.
Freytag J. W., Dickinson J. C., Tseng S. Y. (1984). A high sensitivity affinity-column-mediated immunometric assay, as exemplified by digoxin, Clinical Chemistry, **30**, 417—420.
Habermann V. E. (1970). Ein neus prinzip zur quantitativen bestimmung hochmolekularer antigene, Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem., **8**, 51—55.
Hashida S., Imagawa M., Ishikawa E., Freytag J. W. (1985). A simple method for the conjugation of affinity-purified Fab′ to horseradish peroxidase and β-galactosidase, Molecular Immunology (in press).
Holbeck S. L., Nepon G. T. (1983). Enhanced detection of immunoglobulin binding by a modified ELISA, J. Immunol. Methods, **50**, 47—52.
Imagawa M., Hashida S., Ishikawa E., Freytag J. W. (1984). Preparation of monomeric 2,4-dinitrophenyl Fab′-β-galactosidase conjugate fir immunoenzymometric assays, J. Biochem., **96**, 1727—1735.
Ishikawa E., Kawai T., Miyai K., 1981. Enzyme Immunoassays, Igaku-Shoin, Tokyo, 280 pp.
Ishikawa E., Imagawa M., Yoshitake S., Niitsu Y., Urushizaki I., Inada M., Imura H., Kanazawa R., Tachibana S., Nakazawa N., Ogawa H. (1982). Major factors limiting sensitivity of sandwich enzyme immunoassay for ferritin, immunoglobulin E, and thyroid-stimulating hormone, Ann. Clin. Biochem., **19**, 379—384.
Ishikawa E., Imagawa M., Hashida S., Yoshitake S., Hamaguchi Y., Ueno T. (1983). Enzyme labeling of antibodies and their fragments for enzyme immunoassay immunohistochemical staining, J. Immunoassay, **4**, 109—327.
Leflar C. C., Freytag J. W., Powell L. M., Strahan J. C., Wadsley J. J., Tyler C. A.,

Miller W. K. (1984). An automated affinity-column-mediated enzyme-linked immunometric assay for digoxin on the Du Pont aca[R] discrete clinical analyzer, Clin. Chem., **30**, 1809—1811.
Ling M. C. (Feb. 18. 1974). United States Patent No. 3, 867, 517, Direct Radioimmunoassay for antigens and their antibodies.
Maiolini R., Masseyeff R. (1975). A sandwich method of enzymeimmunoassay. I. Aplication to rat and human alpha-fetoprotein, J. Immunol. Methods, **58**, 293—300.
Nomura M., Imai M., Tasahashi K. (1983). Three-site radioimmunoassay with monoclonals for a sensitive determination of human alpha-fetoprotein, J. Immunol. Methods, **58**, 293—300.
Pecht I., 1982. Dynamic Aspects of Antibody Function. In: The Antigen (M. Sela, ed.), Academic Press, New York, NY. 33—42.
Porstmann B., Porstmann T., Seifert R., Meisel H., Nugel E. (1982). Comparison of direct and indirect two-site binding enzyme immunoassays, Clin. Chim. Acta, **122**, 1—9.
Van Weeman B. K., Schuurs A. H. W. N. (1971). Immunoassays using antigen-enzyme conjugates, FEBS Letters, **15**, 323—326.
Weetall H. H. (1973). Affinity Chromatography, Sep. and Purif. Meth., **2**, 199—229.
Yarmush M. L., Colton C. K., 1983. Affinity Chromatography. In: Comprehensive Biotechnology, Pergamon Press.
Yolken R. H., Leister F. J., Whitcomb L. S., Santosham M. (1983). Enzyme immunoassays for the detection of bacterial antigens utilizing biotin-labeled antibody and peroxidase biotin-avidin complex, J. Immunol. Methods, **56**, 319—327.

Глава 16

Иммуноферментный анализ с использованием эффекта пространственных затруднений (ИФАПЗ)

Альберт Кастро и Нобуо Монджи

Введение

Новый метод иммуноферментного анализа для количественного определения малых антигенов получил название SHEIA (от англ. Steric Hindrance Ensyme Immunoassay — иммуноферментный анализ, основанный на использовании эффекта пространственных затруднений; ИФАПЗ). Он основан на затруднении образования комплекса между ферментом, конъюгированным с антигеном (или гаптеном), и иммобилизованным на агарозе ингибитором фермента при введении в реакцию антител к данному антигену (гаптену). Комплексообразованию препятствуют, вероятно, именно пространственные затруднения, возникающие в результате взаимодействия конъюгата с антителами (Monji, Castro, 1979). Схема анализа представлена на рис. 16-1.

Как в РИА, так и в ИФА критической является стадия разделения связанного и несвязанного лиганда (Ratcliff, 1976; Odell et al., 1975; Collins et al., 1975). Наиболее широкое применение в РИА малых антигенов получил метод разделения при помощи адсорбции. Этот метод основан на отделении метки, не связавшейся с антителами, за счет адсорбции на таких носителях, как древесный уголь с декстрановым покрытием, тальк, смолы; он привлекает своей простотой и воспроизводимостью. Разработанные на сегодняшний день варианты ИФА, за исключением гомогенного ИФА, основаны главным образом на осаждении вторыми антителами или ад-

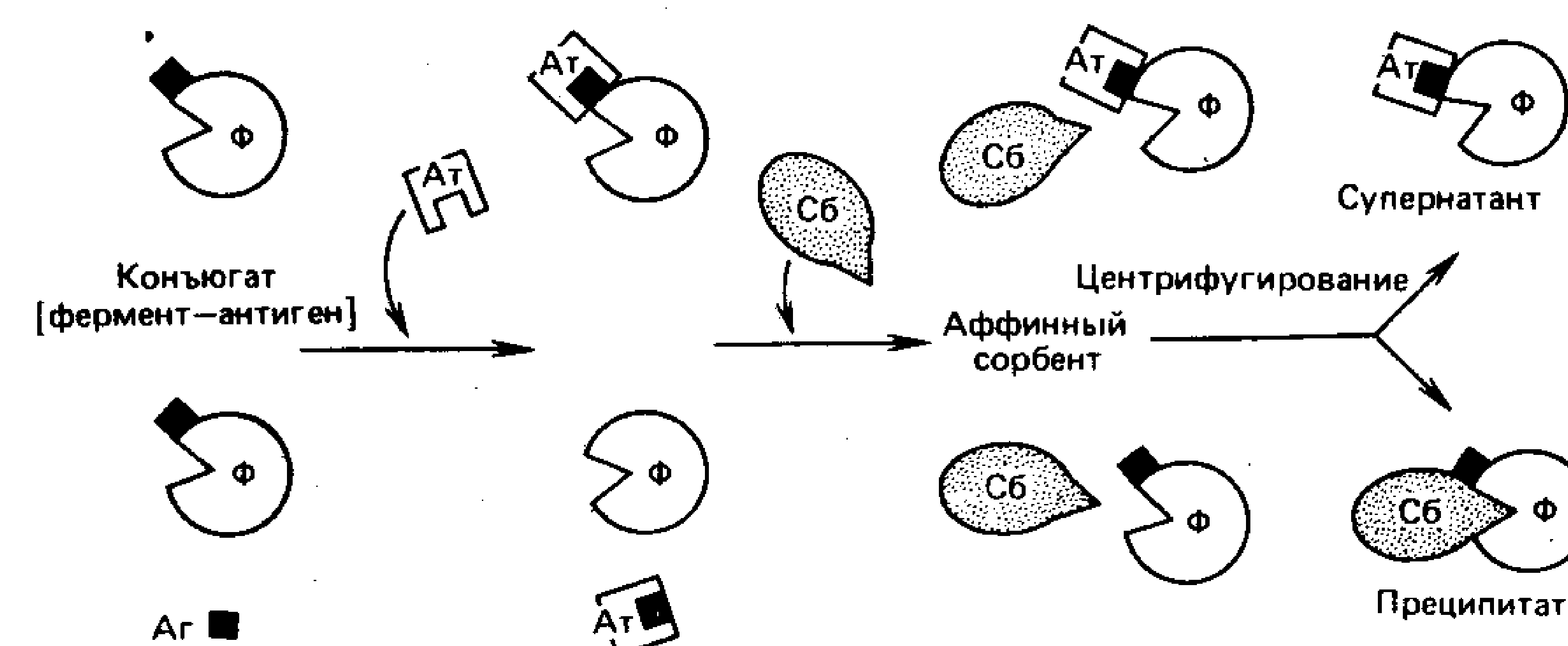


Рис. 16-1. Схема анализа методом ИФАПЗ. Ф — фермент, Ат — антитела, Аг — антиген, Сб — сорбент.

сорбции на твердом носителе (Rubenstein et al., 1972). Наиболее чувствительным, надежным и воспроизводимым до сих пор являлся метод вторых антител, основанный на осаждении комплекса [антитело — антиген с ферментом]. Однако данная система зачастую требует длительной инкубации, многократных промывок и характеризуется сложной кинетикой реакции. Для устранения этих неудобств мы разработали новый вариант разделения с использованием гелей, обладающих сродством к ферменту. В этой системе с помощью аффинного сорбента удаляются только не связанные с антителами конъюгаты [фермент — антиген (или гаптен)]. В данной главе описаны системы ИФАПЗ для хориомаммотропина (ХМТ) и тироксина (T_4).

Методы

Система ИФАПЗ для хориомаммотропина (ХМТ)

Антисыворотка. Антитела кролика против ХМТ получали методом Кастро и др. (Castro et al., 1976). Константа аффинности для этих антител составляла $3{,}1 \cdot 10^9$ M^{-1}.

Приготовление конъюгата [ХМТ — β-галактозидаза]. Для присоединения β-галактозидазы к ХМТ в качестве бифункционального реагента используют N-гидроксисукцинимид-*м*-малеимидобензоат (ГСМБ, Pierce Chemical Co.) (рис. 16-2). Сначала присоединяют ГСМБ к ХМТ: смешивают 800 мкг ГСМБ в 0,16 мл тетрагидрофурана с 15,4 мг ХМТ в 2 мл 50 мМ Na-фосфатного буфера, pH 7,0. Раствор инкубируют при комнатной температуре 30 мин и останавливают реакцию добавлением 1 мл 1,0 М цитратного буфера, pH 5,0. Осадок собирают центрифугированием при 2000 g в течение 15 мин, промывают дважды (по 10 мл) 10 мМ цитратным буфером, pH 5,3. На второй стадии модифицированный ХМТ связывают с β-галактозидазой через тиоэфирный мостик: для этого растворяют осадок модифицированного ХМТ в 1,0 мл Na-фосфатного буфера, pH 7,0, и добавляют этот раствор к 5 мг β-галактозидазы, растворенной в 1,0 мл того же буфера. Тщательно перемешивают и инкубируют раствор 2 ч при комнатной температуре. Для удаления непрореагировавшего ХМТ смесь разделяют хроматографически на колонке с сефадексом G-75 (1×40 см), используя для элюции Na-фосфатный буфер, pH 7,0.

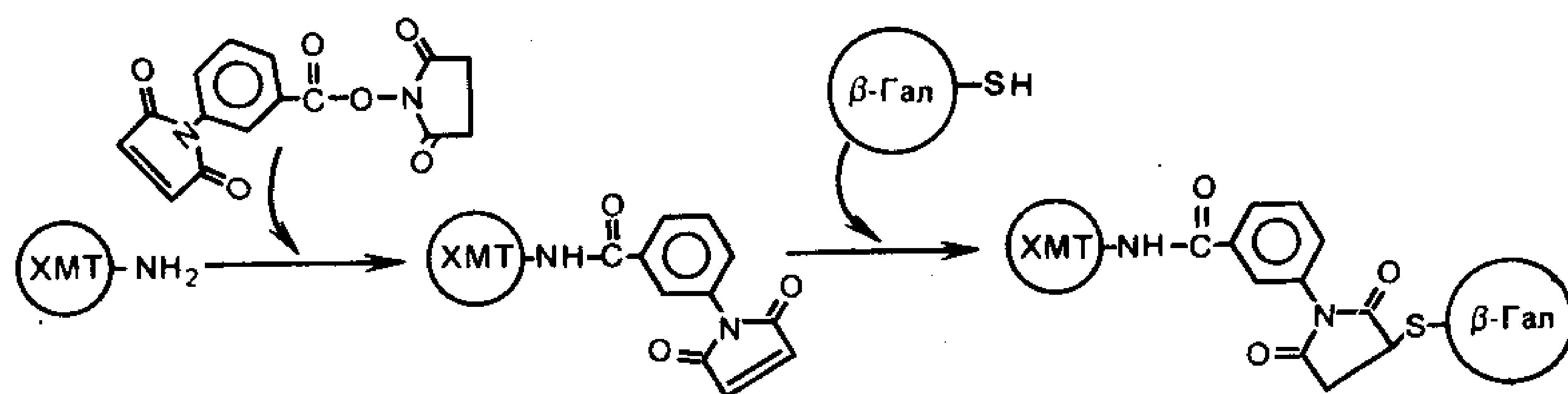


Рис. 16-2. Конъюгация хориомаммотропина (ХМТ) с сульфгидрильными группами β-галактозидазы (β-Гал) через остаток малеимидобензойной кислоты.

Для определения относительного количества фермента, связавшегося с ХМТ, конъюгат смешивают с избытком антител кролика против ХМТ. Затем добавляют в избытке антитела козы против иммуноглобулинов кролика. После отмывки от избытка несвязанного конъюгата определяют ферментативную активность в осадке. Она должна составлять около 80% исходной активности фермента. В контроле с нормальной сывороткой кролика вместо антител против ХМТ ферментативная активность в осадке не обнаруживается.

Получение конъюгата [ХМТ — β-галактозидаза], очищенного аффинной хроматографией. Выделенный, как описано в предыдущем разделе, конъюгат [ХМТ — β-галактозидаза] далее очищают аффинной хроматографией: на колонку 1×5 см с ГА-агарозой (β-D-галактозамин, иммобилизованный на агарозе с помощью остатка 6-аминокапроновой кислоты в качестве спейсера, Pharmacia P-L-Biochemicals), уравновешенную 0,05 М фосфатным буфером, pH 7,0, наносят конъюгат [ХМТ — β-галактозидаза], растворенный в том же буфере. Колонку тщательно промывают тем же фосфатным буфером. Элюцию 0,1 М боратным буфером, pH 10,0, осуществляют после того, как ферментативная активность перестает обнаруживаться в элюате. Фракции, содержащие основную часть активности фермента, собирают и диализуют 24 ч против 1 л фосфатного буфера. После диализа добавляют азид натрия до концентрации 0,05%, 2 мкл/мл 1 М $MgCl_2$ и хранят раствор при 4 °С. Ферментативную активность определяют методом, описанным в работе Дрея и др. (Dray et al., 1975). Для определения относительного количества фермента, связанного с ХМТ, конъюгат смешивают с избытком антител кролика против ХМТ, после чего добавляют избыток антител против иммуноглобулинов кролика. В полученном осадке содержится более 90% исходной активности фермента. В контроле с сывороткой кролика, не содержащей антител против ХМТ, ферментативной активности в осадке не обнаруживается.

Проведение анализа

Схема анализа приведена на рис. 16-1. В стеклянную пробирку 16×10 мм вносят 150 мкл фосфатного буфера, а затем добавляют 5 мкл стандартного раствора, содержащего 0, 2, 4, 5 или 10 мг/л ХМТ и 5% БСА. Последовательно добавляют по 100 мкл конъюгата [ХМТ — β-галактозидаза] в соответствующем

разведении и 0,5%-ного БСА в фосфатном буфере. После перемешивания вносят 100 мкл кроличьей антисыворотки против ХМТ в разведении 1 : 1000 и инкубируют 1 ч при 4 °С. После добавления 100 мкл фосфатного буфера, содержащего 5 мкл набухшей ГА-агарозы, пробирку осторожно (100 об/мин) встряхивают в шейкере в течение часа. По окончании встряхивания ее центрифугируют 10 мин при 2000 g, отбирают 250 мкл супернатанта и определяют ферментативную активность.

Система ИФАПЗ для T_4

Для получения антисыворотки против T_4 и конъюгата [T_4—β-галактозидаза] применяли методы, описанные в начале следующей главы. Конъюгат [T_4—β-галактозидаза], очищенный аффинной хроматографией на ГА-агарозе, получали аналогично тому, как описано для конъюгата [ХМТ—β-галактозидаза].

Результаты

Для определения глубины протекания конъюгации ХМТ с β-галактозидазой, оптимизации условий конъюгации и хода анализа были проведены следующие исследования.

С целью осаждения фермента из реакционной смеси к раствору добавляли ГА-агарозу и инкубировали на качалке (100 об/мин) в течение 30, 60, 90 и 120 мин. После осаждения сорбента центрифугированием в супернатанте определяли ферментативную активность. Результаты показывают, что после 60 или более минут инкубации в супернатанте обнаруживается лишь 5% исходной активности фермента, тогда как 95% внесенного фермента связывается с 5 мкл ГА-агарозы (рис. 16-3).

В реакции конъюгации ХМТ с β-галактозидазой (без последующей аффинной очистки конъюгата) была обнаружена зависимость величины остаточной активности фермента в супернатанте от молярного соотношения этих реагентов. При ожидаемых для конъюгата молярных соотношениях ХМТ и β-галактозидазы 8 : 1 и 12 : 1 ферментативная активность в супернатанте составила соответственно 30% и 50% исходной, в то время как понижение молярного соотношения до 4 : 1 и менее снижало остаточную активность до 10% исходной. Наблюдаемое ослабление связывания конъюгата [ХМТ—β-галактозидаза] с ГА-агарозой объясняется, вероятно, пространственными затруднениями, возникающими при использовании сверхконъюгированного ХМТ. Однако после очистки таких конъюгатов на колонке с ГА-агарозой остаточная активность фермента в супернатанте в тех же условиях снижалась приблизительно до 5% исходной, вероятно, в результате удаления сверхконъюгированной фракции [ХМТ—β-галактозидаза] (рис. 16-4). Связывание очищенного конъюгата [ХМТ—β-галактозидаза] с антителами к ХМТ приводит к полному предотвращению образования комплексов между ХМТ—β-галактозидазой и ГА-агарозой. Столь полного ингибирования связывания конъюгата [ХМТ—β-галактозидаза] с ГА-агарозой не наблюдалось в случае конъюгатов с молярными соотношениями ХМТ и β-галактозидазы 4 : 1 или менее (рис. 16-4). Эти результаты указывают на необходимость подбора оптимального молярного соотношения β-галактозидазы и ХМТ в конъюгатах для проведения эффективного определения методом ИФАПЗ. Снижение уровня фона путем очистки конъюгата [ХМТ—β-галактозидаза] на колонке с ГА-агарозой и высокая эффективность ингибирования связывания [ХМТ—β-галактозидаза] с ГА-агарозой антителами к ХМТ

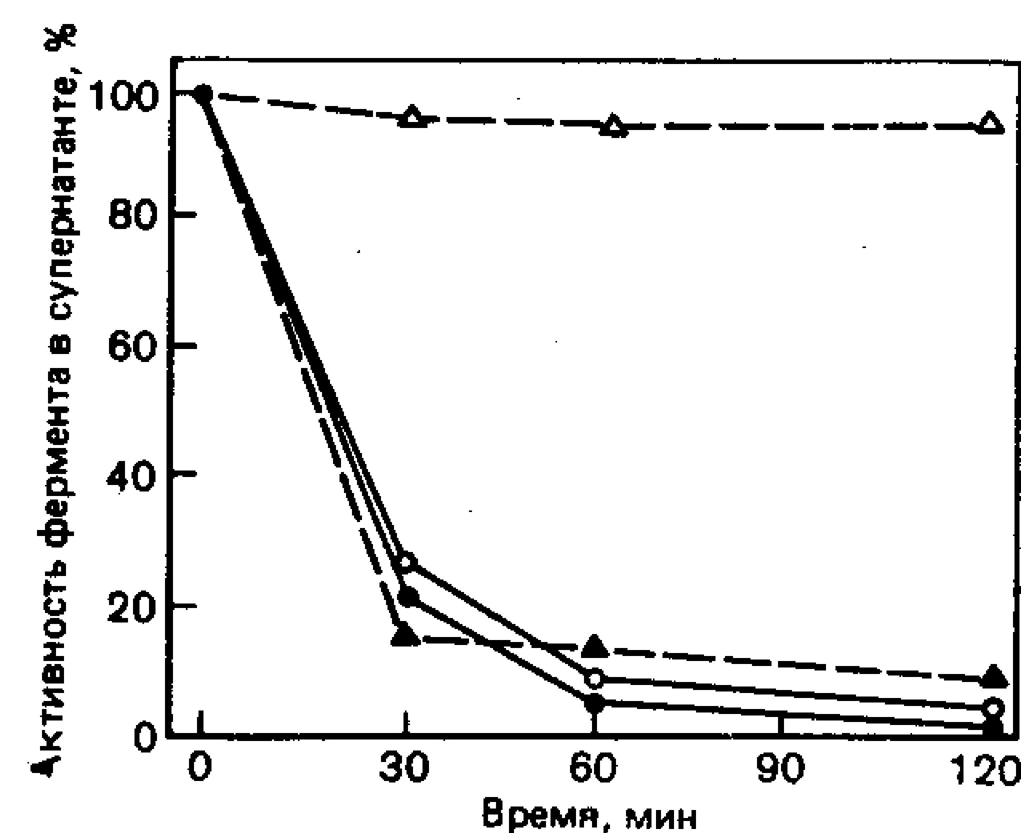


Рис. 16-3. Влияние времени инкубации на формирование комплекса [ХМТ — фермент] с ГА-агарозой. ХМТ был конъюгирован с β-галактозидазой методом, описанным в тексте. Отношение [ХМТ : фермент] в каждом конъюгате точно не определяли; указанные здесь отношения [ХМТ : фермент] — это ожидаемые значения, вычисленные на основании результатов, полученных в работе Китагавы и Аикавы (Kitagawa, Aikawa, 1976). Использованные конъюгаты [ХМТ — фермент] перед опытом были очищены с помощью аффинной хроматографии. Темные кружки — [ХМТ — фермент (2 : 1)] без антител; светлые кружки — [ХМТ — фермент (2 : 1)], инкубированный 1 ч с антителами к ХМТ до разделения; темные треугольники — [ХМТ — фермент (8 : 1)] без антител; светлые треугольники — [ХМТ — фермент (8 : 1)], инкубированный 1 ч с антителами к ХМТ до разделения.

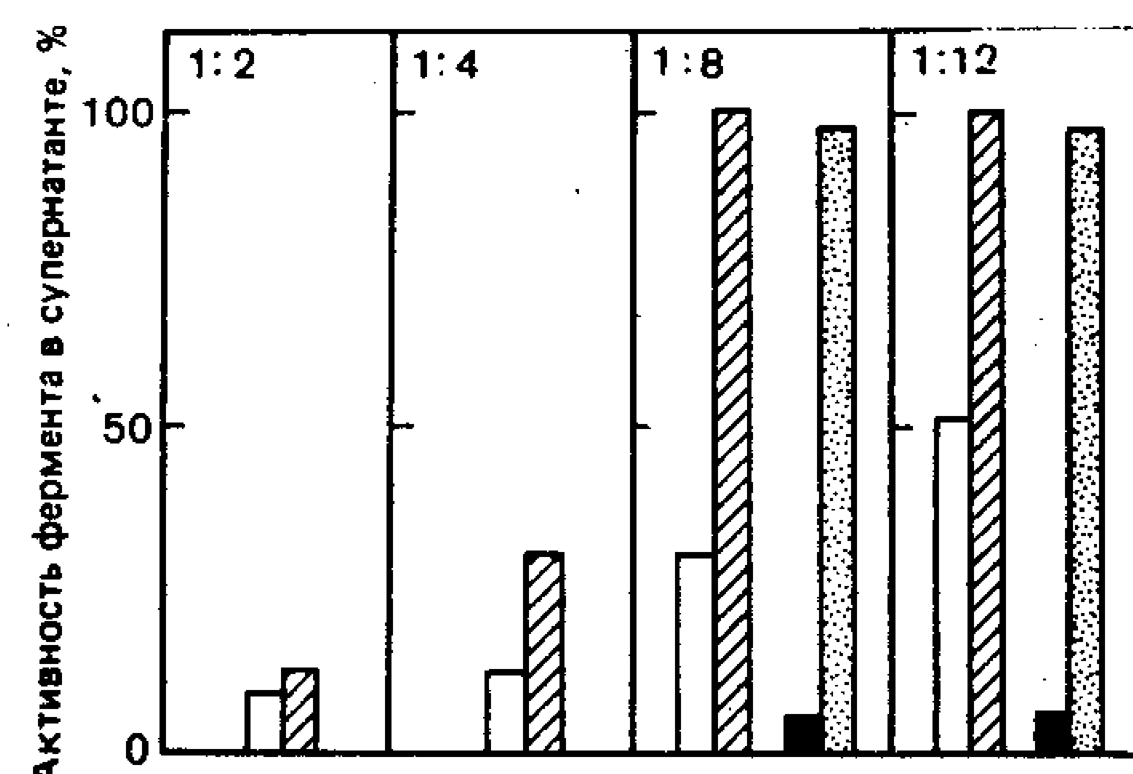


Рис. 16-4. Влияние молярных соотношений ХМТ и фермента на образование комплекса [ХМТ — фермент] с ГА-агарозой. Светлые столбики — конъюгат [ХМТ — фермент] до очистки с помощью аффинной хроматографии; темные столбики — конъюгат [ХМТ — фермент], очищенный с помощью аффинной хроматографии; заштрихованные столбики — конъюгат [ХМТ — фермент], не подвергавшийся очистке с помощью аффинной хроматографии, инкубированный 1 ч с антителами к ХМТ до стадии разделения; столбики, заполненные точками — очищенный при помощи аффинной хроматографии конъюгат [ХМТ — фермент], инкубированный 1 ч с антителами к ХМТ до стадии разделения.

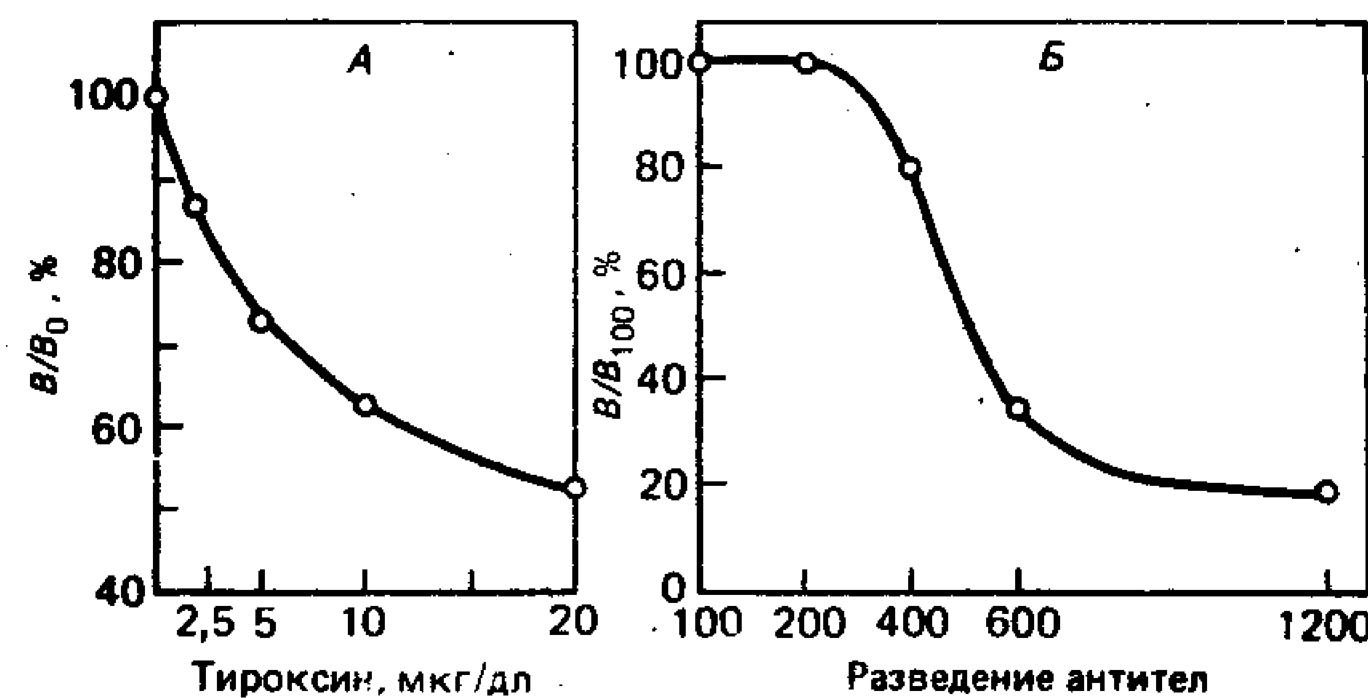


Рис. 16-5. Стандартная кривая для T_4 (*А*) и кривая титрования антител против T_4 (*Б*).

позволяет успешно применять метод ИФАПЗ для анализа ХМТ. Максимальная чувствительность анализа достигает 4 нг на пробирку. По стандартной кривой система анализа была подобрана для диапазона концентраций 0—10 мг/л с максимальной чувствительностью в области 0—4 мг/л при объеме образца 5 мкл.

Что касается системы ИФАПЗ для T_4, то оптимизация, равно как и ход анализа, были в сущности такими же, как и в случае ИФАПЗ для ХМТ. Ход кривой титрования антител при выборе их оптимальной концентрации и ход стандартной кривой для T_4 позволяют рассчитывать на то, что метод ИФАПЗ удастся использовать для малых гаптенов (рис. 16-5).

Обсуждение результатов

Одним из наиболее эффективных ингибиторов β-галактозидазы *E. coli,* является β-D-галактозамин (k_i=0,225 мМ) (Lai, Axelrod, 1973). Для очистки β-галактозидазы из разных источников с помощью аффинной хроматографии широко используется агароза, модифицированная галактозамином, связанным с матрицей через остаток 6-аминокапроновой кислоты (Harpaz et al., 1974). Показано (Steers, Cuatrecasas, 1974), что эффективное связывание β-галактозидазы с иммобилизованным ингибитором достигается только при использовании достаточно большого спейсера (цепочки из по крайней мере 6 углеродных атомов) для увеличения расстояния между β-галактозамином и агарозной матрицей. Это указывает на наличие достаточно строгих требований к физико-химическим условиям, в которых может реализовываться связывание [фермент — ингибитор]. Мы разработали вариант иммуноферментного анализа, основанный непосредственно на эффекте нарушения этих требований из-за пространственных затруднений, возникающих в результате взаимодействия с антителами. Хотя для разделения молекул конъюгата [ХМТ—β-галактозидаза], связанных и не связанных с антителами к ХМТ, мы использовали статический метод,

вполне возможным представляется использование метода ИФАПЗ с применением аффинных колонок в автоматизированных системах с непрерывным потоком. Что касается альтернативных аффинных сорбентов, то совсем недавно было обнаружено, что для связывания β-галактозидазы гораздо более эффективными являются иммобилизованные на агарозе 6-аминокапроил- или 4-аминобутилпроизводные *п*-аминофенил-β-D-галактопиранозида (при этом инкубация на качалке занимает лишь 15 мин вместо 60 мин; неопубликованные данные). Мы исследовали также возможность использования для метода ИФАПЗ аффинных гелей с иммобилизованными коферментами.

Литература

Castro A., Priesto I., Wunsch C., Ertingshausen G., Malkus H. (1976). Automated radioimmunoassay of choriomammotropin (human placental lactogen), Clin. Chem., **22**, 1655—1658.

Collins W. P., Barnard G. J. R., Hennan J. F., 1975. Factors affecting the choice of separation techniques, In: Steroid Immunoassay, Proceeding of the Fifth Tenivus Workshop (E. H. D. Cameron, S. G. Hillier and K. Griffiths, eds.), Alpha Omega, Wales, UK, pp. 223—225.

Dray F., Andrieu J. E., Renaud F. (1975). Enzyme immunoassay of progesterone at the picogram level using β-galactosidase as label, Biochem. Biophys. Acta, **403**, 131—138.

Harpaz N., Flowers H. M., Sharon N. (1974). Purification of coffee bean β-galactosidase by affinity chromatography, Biochem. Biophys. Acta, **341**, 213—221.

Kitagawa T., Aikawa T. (1976). Enzyme coupled immunoassay for insulin using a novel coupling reagent, J. Biochem. (Tokyo), **79**, 233—236.

Lai H. Y. L., Axelrod B. (1973). 1-Aminoglycosides, a new class of specific inhibitors of glycosides, Biochem. Biophys. Res. Commun., **54**, 464—468.

Monji N., Castro A. (1979). Steric Hindrance Enzyme Immunoassay (SHEIA); a novel method in enzyme immunoassay, Res. Commun. Chem. Path. Pharm., **26**, 187—196.

Odell W. D., Silver C., Grover P. K., 1975. Competitive protein binding assays methods of spearation of bound from free. In: Steroid Immunoassay, Proceeding of the Fifth Tenovus Workshop (E. H. D. Cameron, S. G. Hillier and K. Griffiths, eds.), Alpha Omega, Wales, UK. p. 207—222.

Ratcliff J. G. (1976). Radioimmunoassay and saturation analysis; separation techniques in saturation analysis, Brit. Med. Bull., **30**, 32—37.

Rubenstein K. E., Schneider R. S., Ullman E. F. (1972). «Homogeneous» enzyme immunoassay. A new immunochemical technique, Biochem. Biophys. Res. Comm., **47**, 846—851.

Steers E., Cuatrecasas P. (1974). β-Galactosidase, Methods in Enzymology, **34**, 350—358.

Связывание малеимидных производных гаптенов с ферментами для использования в ИФА

Нобуо Монджи, Альберт Кастро

Введение

Наиболее широко используемым агентом для конъюгации антител или высокомолекулярных антигенов с различными ферментами является глутаровый альдегид. Для конъюгации β-галактозидазы с белками, в частности с иммуноглобулинами и их фрагментами, используют также малеимидные производные (Ishikawa, 1983). Применение таких сшивающих агентов не влечет за собой ощутимого снижения активности фермента в результате вовлечения в процесс связывания его сульфгидрильных групп. Связывание гаптенов с ферментами зачастую осуществляется идентично процессу получения конъюгатов [гаптен — белок] для иммунизации. При таком связывании, когда в реакцию вовлекаются аминогруппы и карбоксильные группы фермента, наблюдается либо снижение эффективности процесса (Dray et al., 1975), либо уменьшение активности фермента (Comoglio, Celada, 1976). В целях преодоления этих недостатков для связывания с сульфгидрильными группами фермента мы использовали *м*-малеимидные производные гаптенов. В этом случае была обнаружена высокая эффективность связывания с ферментом без существенного снижения его активности. Использование β-галактозидазы в качестве индикаторного фермента имеет следующие преимущества: 1) она доступна в высокоочищенном виде; 2) характеризуется высокой ферментативной активностью; 3) связывание по ее сульфгидрильным группам не ведет к снижению каталитической активности фермента; 4) как сам фермент, так и его конъюгат стабильны в течение года, если их хранить при 4 °C и 5) активность β-галактозидазы человека и животных в рабочем диапазоне pH ИФА пренебрежимо мала. В настоящей главе рассмотрены особенности приготовления и использования *м*-малеимидобензоильных производных кортизола, тироксина и дигоксина. Для всех описанных здесь методов анализа характерна высокая чувствительность, сравнимая с чувствительностью РИА, и чрезвычайно высокая специфичность по отношению к анализируемому компоненту (Monji et al., 1978, 1980a, 1980b).

Методы

Иммуноферментный анализ тироксина

Синтез м-малеимидобензольного производного метилового эфира-L-тироксина. Мета-малеимидобензойную кислоту (МБК) получают следующим образом: *м*-карбоксималеанилиновую кислоту синтезируют из *м*-аминобензойной кислоты и малеинового ангидрида методом Паролы (La Parola, 1934), после чего получают МБК циклизацией в присутствии уксусного ангидрида по методу Сирла (Searle, 1948). Для получения метилового эфира L-тироксина (Ashley, Harington, 1929) растворяют 200 мкг МБК в 3 мл тионилхлорида ($SOCl_2$) и нагревают с обратным холодильником в течение 30 мин. Отгоняют избыток $SOCl_2$ под вакуумом и выдерживают бледно-желтый порошок *м*-малеимидобензоилхлорида (МБХ) в эксикаторе над $CaCl_2$ в течение ночи. Растворяют высушенный МБХ в 10 мл тетрагидрофурана (ТГФ) и добавляют по каплям при перемешивании в раствор, содержащий 400 мкг метилового эфира L-тироксина и 400 мкг суспендированного карбоната натрия в ТГФ. Нагревают реакционную смесь с обратным холодильником в течение 30 мин. Реакцию контролируют при помощи тонкослойной хроматографии (ТСХ), используя в качестве элюента этилацетат. Реакционную смесь фильтруют и после отгонки растворителя под вакуумом получают неочищенный бледно-желтый продукт. Очищают метиловый эфир *м*-малеимидобензол-L-тироксина (МЭМБТ) хроматографией на колонке (1,5×30 см) с силикагелем, используя в качестве элюента хлороформ. Полученный белый порошок МЭМБТ дает при ТСХ в системе этилацетата единственное пятно с $R_f=0{,}56$. Присутствие малеимидной группы в выделенном продукте проверяют при помощи ИК-спектроскопии и по его способности реагировать с цистеином (Grassetti, Murray, 1967). Точка плавления полученного эфира 137—141 °C.

Связывание β-галактозидазы с МЭМБТ. Добавляют 50 мкл раствора МЭМБТ в ТГФ (0,2 мг/мл, 10 нмоль) к 1,5 мл 0,05 М фосфатного буфера, pH 7,0, содержащего β-галактозидазу (0,5 мг, или 0,93 нмоль, Boehringer Mannheim Biochemical). Смесь инкубируют 2 ч при комнатной температуре. После диализа в течение ночи против того же фосфатного буфера смесь очищают хроматографией на колонке (1,5×40 см) с сефадексом G-25. Для анализа T_4 используют фракции элюата, содержащие максимальную ферментативную активность, при оценке которой (Dray et al., 1975) роль субстрата играет *о*-нитрофенил-β-D-галактозид.

Антисыворотка. Антисыворотку к T_4 получают иммунизацией кроликов препаратом T_4 в комплексе с бычьим сывороточным альбумином, приготовленным по методике Гариба и др. (Gha-

rib et al., 1971). Перекрестной реакции с триодтиронином практически не наблюдается. Используют козьи антитела к иммуноглобулинам кролика (Calbiochem).

Методика ИФА. 100 мкл в 100 раз разведенной фракции конъюгата [МЭМБТ — фермент] с максимальной ферментативной активностью, элюированной с колонки с сефадексом G-25, вносят в стеклянную пробирку 16×100 мм, добавляют 500 мкл, 0,05 М фосфатного буфера, рН 7,0, содержащего 0,5 мМ Na-соль 8-анилинонафталинсульфоновой кислоты. Добавляют по 50 мкл стандартных растворов, содержащих 0, 2, 4, 8, 12 или 20 мкг/100 мл L-тироксина в сыворотке, а затем — по 100 мкл разведенной в 400 раз антисыворотки кролика против тироксина. После инкубации в течение 45 мин при комнатной температуре добавляют по 100 мкл разбавленной в 20 раз нормальной сыворотки кролика, после чего вносят по 100 мкл антител козы к иммуноглобулинам кролика. После встряхивания пробирку инкубируют 15 мин во льду и центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин. Осадок дважды промывают фосфатным буфером и ресуспендируют в 0,5 мл 0,05 М фосфатного буфера, рН 7,5, с 0,1% БСА. Активность фермента измеряют, используя в качестве субстрата *о*-нитрофенил-β-D-галактозид. Время инкубации для оценки ферментативной активности составляет 45 мин. Количество *о*-нитрофенола, образовавшегося к моменту завершения реакции, измеряют спектрофотометрически при длине волны 420 нм.

Иммуноферментный анализ кортизола

Синтез кортизол-21-м-малеимидбензоата (К-МБ). 100 мг МБХ растворенного в 2 мл ТГФ, добавляют по каплям к кортизолу (148 мг в 2 мл ТГФ). Смесь нагревают в течение часа, контролируя ход синтеза посредством ТСХ в системе этилацетата (R_f=0,67). Продукт реакции очищают хроматографией на колонке (1,5×30 см) с силикагелем, используя в качестве элюента смесь хлороформ — этилацетат (3 : 1). Выделенный продукт при ТСХ проявляется в виде единственного пятна, флуоресцирующего в ультрафиолете после опрыскивания 10%-ным раствором серной кислоты в этаноле и прогревания. Этерификацию в 21-м положении проверяют по иммунологической активности продукта во взаимодействии с антисывороткой против кортизола, а присутствие малеимидной группы — по способности реагировать с цистеином (Grassetti, Murray, 1967). Структура К-МБ показана на рис. 17-1 (температура плавления 134—136 °С).

Получение м-малеимидобензольного производного кортизол-21-гемисукцината (КГС-МБ) с использованием в качестве сшивающего агента п-фенилендиамина. 100 мг КГС растворяют в 4 мл ТГФ и охлаждают до —10 °С, после чего добавляют 20 мкл трибутиламина. После добавления 20 мкл изобутилхлорформиата смесь перемешивают и инкубируют 30 мин. К раствору *п*-фенилендиамина (400 мг) в ТГФ по каплям добавляют активированный КГС и инкубируют 60 мин. За синтезом *п*-фенилендиаминового производного КГС наблюдают при помощи ТСХ (R_f= =0,22) в системе этилацетат — хлороформ (90 : 10). Эту же систему используют при хроматографии на колонке (1,5×40 см) с силикагелем для очистки продукта реакции.

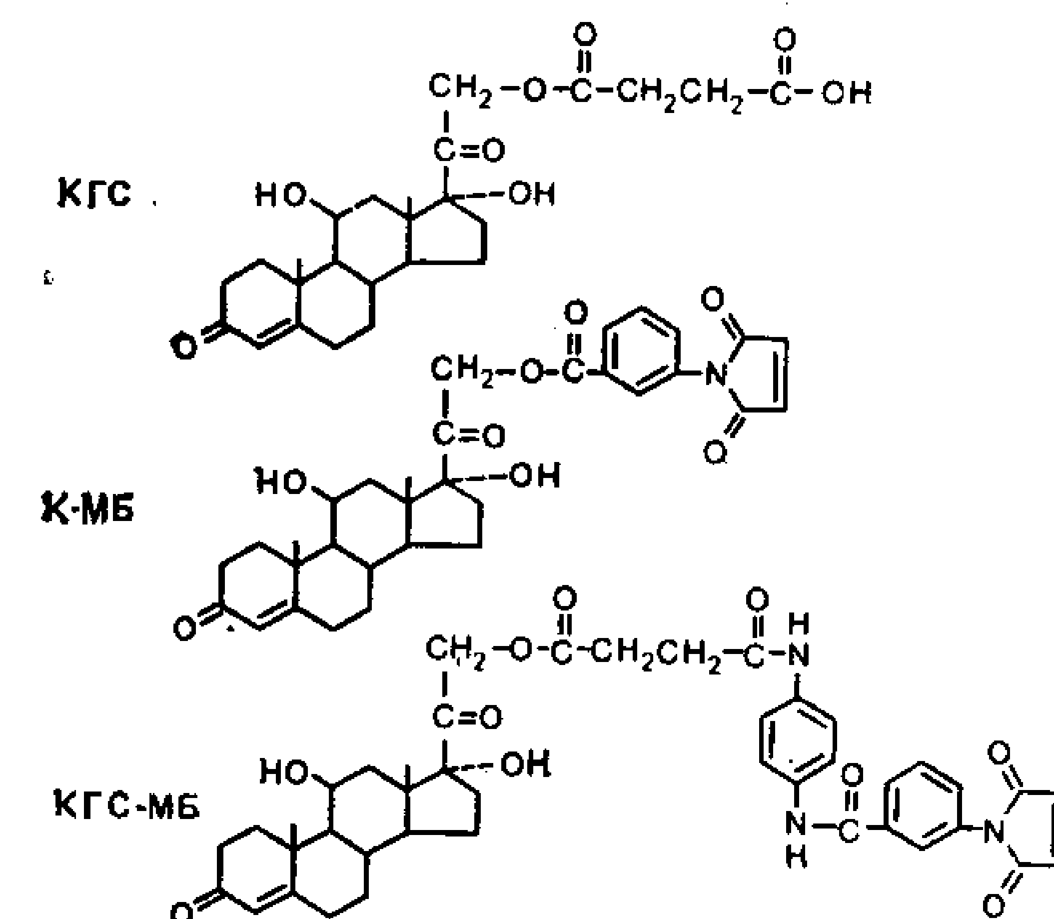


Рис. 17-1. Структура кортизол-21-гемисукцината (КГС), кортизол-21-*м*-малеимидбензоата (К-МБ) и *м*-малеимидбензойной кислоты, связанной с кортизол-21-гемисукцинатом через остаток *п*-фенилендиамина (КГС-МБ).

Очищенное вещество при ТСХ дает единственное пятно, вступающее в реакцию с нингидрином и флуоресцирующее при УФ-облучении после обработки серной кислотой и прогревания. Растворяют полученное смолоподобное вещество в ТГФ и по каплям добавляют к раствору, содержащему 20 мг МБХ и 200 мг карбоната натрия в ТГФ. Смесь нагревают с обратным холодильником в течение 30 мин. Синтез конечного продукта контролируют при помощи ТСХ (R_f=0,26) в системе этилацетат — хлороформ (3 : 1). Эту же систему используют для очистки конечного продукта при помощи колоночной хроматографии. Очищенное вещество дает единственное пятно при ТСХ, обнаруживаемое с помощью обработки серной кислотой и прогревания. Присутствие малеимидной группы в очищенном веществе проверяют по взаимодействию с цистеином (Grassetti, Murray, 1967). Строение КГС-МБ показано на рис. 17-1 (температура плавления 161—163 °С).

Приготовление конъюгата [КГС—β-галактозидаза]. КГС присоединяют к β-галактозидазе методом смешанных ангидридов (Comoglio, Celada, 1976).

Приготовление конъюгатов [КГС-МБ—β-галактозидаза] и [К-МБ—β-галактозидаза]. Присоединение КГС-МБ или К-МБ к β-галактозидазе в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,0 (буфер А), и очистку конъюгата [фермент-гаптен] на колонке с сефадексом G-25 проводили аналогично процессу получения и очистки конъюгата [T_4—β-галактозидаза].

Получение антисыворотки к кортизолу. Для получения антисыворотки против комплекса КГС-БСА иммунизировали кроликов по методу Рудера и др. (Ruder et al., 1972). Полученная

сыворотка по данным РИА и ИФА характеризовалась очень высокой специфичностью.

Стандартные растворы кортизола. Исходный раствор кортизола в этаноле (100 мкг/мл) разводят 0,05 М фосфатным буфером, pH 7,3, с 0,1% БСА (буфер Б) и хранят стандартные растворы (0—50 мкг/дл) в кельвинаторе в аликвотах по 10 мл. (Они стабильны по меньшей мере в течение 6 мес).

Методика иммуноферментного анализа. Смешивают в стеклянных пробирках (16×100 мм) по 20 мкл стандартных растворов или образцов плазмы с 30 мкл буфера А. Осторожно перемешав, прогревают растворы в кипящей водяной бане 10 мин. После охлаждения добавляют 0,4 мл буфера Б и 0,1 мл раствора конъюгата. Растворы перемешивают и добавляют 0,1 мл антисыворотки против кортизола в разведении 1 : 500 (конечное разведение 1 : 3000) и инкубируют при комнатной температуре в течение 60 мин. После добавления 100 мкл нормальной сыворотки кролика, разведенной в 40 раз, приливают 100 мкл раствора козьих антител против иммуноглобулинов кролика. Смесь перемешивают на вортексе, инкубируют 2 ч при 4 °С, затем центрифугируют 10 мин при 2000 g. Осадок дважды промывают буфером Б. Активность фермента в осадке определяют с использованием в качестве субстрата *о*-нитрофенил-β-D-галактозида. Время инкубации при измерении ферментативной активности 1 ч. Количество образовавшегося к концу реакции *о*-нитрофенола определяют спектрофотометрически при 420 нм.

Иммуноферментный анализ дигоксина

Приготовление дигоксигенин-3-О-сукцината. Синтез дигоксигенин-3-О-сукцината проводят по методу Оливера и др. (Oliver et al., 1968). В 12 мл пиридина растворяют одновременно 0,7 г ангидрида янтарной кислоты и 2 г дигоксигенина. Защищая раствор от воздействия света, инкубируют его 90 дней при комнатной температуре, после чего выливают в 75 мл холодной 2 н. H_2SO_4. Твердую фазу отделяют фильтрацией и промывают холодной водой. Полученный продукт растворяют в 150 мл смеси хлороформ — метанол (2 : 1). Этот раствор промывают экстракцией 25 мл 1 н. H_2SO_4 и трижды водой. После каждой промывки добавляют 25 мл метанола. Раствор упаривают досуха на роторном испарителе над безводным сульфатом натрия. Сухое вещество растворяют в 15 мл горячего этанола и добавляют горячую воду до помутнения раствора. Дают раствору остыть и оставляют его на 48 ч при 4 °С. Кристаллический продукт отделяют фильтрацией и трижды промывают холодным 60%-ным этанолом. Конечный продукт представляет собой белый порошок с температурой плавления 190—197 °С. Этерификацию в положении 3 проверяют по взаимодействию с сывороткой против дигоксина.

Синтез п-(дигоксигенин-3-О-сукцинамидо)аналина. 50 мг дигоксигенин-3-О-сукцината растворяют в 2 мл ТГФ и добавляют 25 мл трибутиламина. Раствор охлаждают при —10°С, добавляют 25 мл изобутилхлорформиата и инкубируют 1 ч при —10 °С. Осадок отделяют фильтрацией при —5 °С, а супернатант по каплям добавляют при перемешивании к охлажденному до —5 °С ТГФ (2 мл), содержащему 200 мг *п*-фенилендиамина. Раствор инкубируют 2 ч при комнатной температуре. За ходом реакции наблюдают с помощью ТСХ в системе этилацетата. Продукт реакции дает нингидрин-положительное пятно, флуоресцирующее при УФ-облучении (R_f=0,28). Его очищают хроматографией на колонке с использованием в качестве элюента этилацетата. Температура плавления продукта 172—178 °С.

Синтез м-малеимидобензоильного производного п-(дигоксигенин-3-О-сукцинамид)анилина (ДСА-МБ). В 5 мл ТГФ растворяют 50 мг *п*-(дигоксигенин-3-О-сукцинамид)анилина (ДСА) и к раствору добавляют 50 мг Na_2CO_3. В 2 мл ТГФ растворяют 30 мг МБХ, полученного как описано ранее, и добавляют по каплям к раствору ДСА. Смесь нагревают с обратным холодильником в течение 30 мин, наблюдая за ходом реакции с помощью ТСХ (R_f=0,35) в системе этилацетата. Продукт реакции дает при ТСХ нингидрин-отрицательное пятно, флуоресцирующее при УФ-облучении. Его очищают хроматографией на колонке с силикагелем, используя в качестве элюента систему хлороформ — этилацетат (3 : 7). Температура плавления продукта 250—256 °С. Присутствие в конечном продукте малеимидной группы проверяют по способности реагировать с цистеином (Grassetti, Murray, 1967).

Получение антител против дигоксина. Конъюгат [дигоксин — БСА] для иммунизации получают методом Смита и др. (Smith et al., 1970).

Получение конъюгата [фермент — гаптен]. Присоединение ДСА-МБ к β-галактозидазе осуществляют так же, как это описано для T_4 в разделе, посвященном ИФА T_4. К 1,5 мл 0,5 М фосфатного буфера, pH 7,0, содержащего 0,5 мг β-галактозидазы (0,93 нмоль), добавляют раствор ДСА-МБ ТГФ (0,2 мг/мл, 10 нмоль). Смесь инкубируют 2 ч при комнатной температуре. После диализа в течение ночи против того же фосфатного буфера смесь очищают хроматографией на колонке (1,5×40 см) с сефадексом G-25. Для анализа дигоксина используют фракции с максимальной ферментативной активностью.

Стандартные растворы дигоксина. Делают серию разведений исходного раствора дигоксина в диметилсульфоксиде (1 мг/мл) 0,05 М фосфатным буфером, pH 7,3, содержащим 0,1% БСА. Стандартные растворы (0—5 нг/мл) хранят в аликвотах по 10 мл при —20 °С.

Методика иммуноферментного анализа. 50 мкл стандартного раствора или образца плазмы вносят в стеклянную пробирку (12×75 мм), содержащую разведенный препарат конъюгата в 0,4 мл фосфатного буфера с БСА. После перемешивания добавляют 100 мкл антисыворотки козы против дигоксина и инкубируют в течение ночи. Затем добавляют 0,4 мл препарата иммобилизованных на носителе антител кролика против иммуноглобулинов козы («Immunobeads», производство фирмы Bio-Rad Labs), перемешивают и инкубируют 2 ч. Твердую фазу осаждают центрифугированием в течение 10 мин при 2000 g и промывают трижды 1 мл фосфатного буфера с БСА. Измеряют ферментативную активность в осадке описанным ранее методом. Время инкубации при определении ферментативной активности 120 мин. Количество *о*-нитрофенола, образовавшегося к концу реакции, определяют спектрофотометрически при 420 нм.

Результаты и обсуждение

При разработке ИФА для T_4 методом осаждения вторыми антителами (при избытке антител к T_4) было обнаружено, что в том случае, когда конъюгацию МЭМБТ с β-галактозидазой проводят при молярных соотношениях более 5:1, с МЭМБТ связывается более 90% фермента. Число молекул МЭМБТ, приходящихся на молекулу фермента, непосредственно не определяли. Поскольку β-галактозидаза содержит около 10—12 сульфгидрильных групп, способных реагировать с *п*-хлормеркурбензойной кислотой (Wallenfels, 1964) и иодоуксусной кислотой (Jorwall, 1978), максимальное число молекул МЭМБТ, связанных с молекулой фермента, может достигать 12.

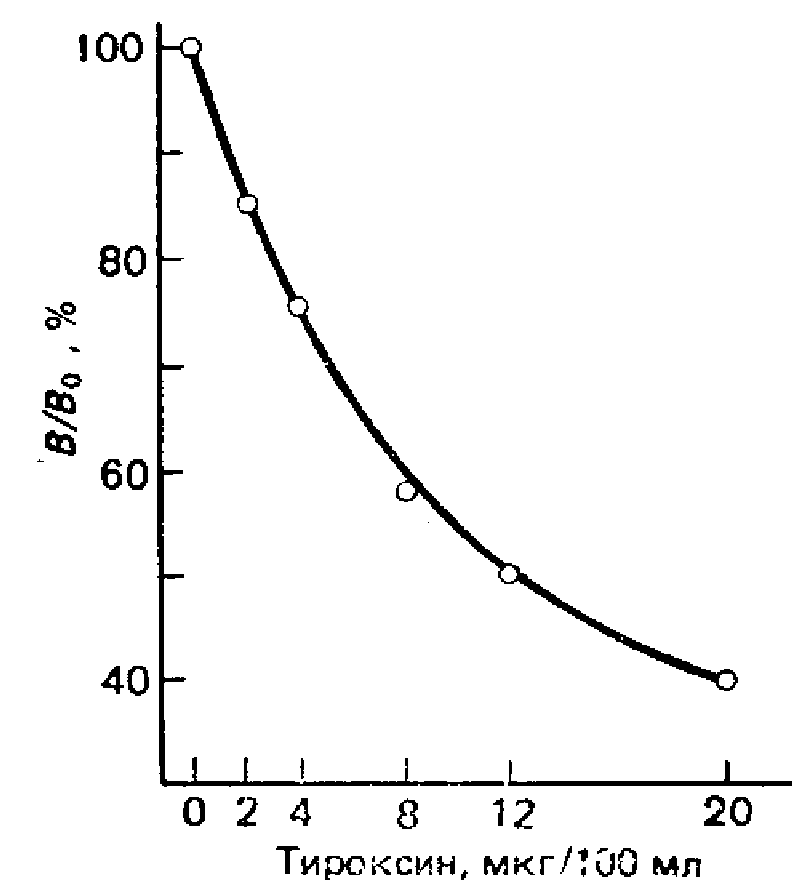


Рис. 17-2. Стандартная кривая для иммуноферментного анализа тироксина.

Практически предел для увеличения молярного соотношения между МЭМБТ и ферментом в конъюгате определяется ограниченной растворимостью эфира в буфере для конъюгации, не превышающей 10 мкг/мл. Было обнаружено, что малеимидные группы МЭМБТ весьма лабильны. По истечении 3 ч после растворения 1 мкг МЭМБТ в 1 мл 0,05 М фосфатного буфера, pH 7,0, ~50% этих групп было утрачено. Поэтому реакцию конъюгации проводят немедленно после растворения МЭМБТ в буфере. Как показало сравнение ферментативной активности до и после конъюгации, важные для активности функциональные группы оказываются при этом незатронутыми. Было продемонстрировано, что осуществление надежно воспроизводимого иммуноферментного анализа T_4 возможно при конечном разведении антисыворотки в 2400 раз (рис. 17-2). Времена инкубации на стадиях конкурентного связывания T_4 с конъюгатом [МЭМБТ — фермент] и осаждения вторыми антителами составляют 45 и 15 мин соответственно. Максимальная чувствительность анализа наблюдается в интервале концентраций тироксина 0—10 мкг/100 мл.

Таблица 17-1. Эффективность связывания фермента с гаптеном и влияние конъюгации на активность фермента

Производное гаптена	Эффективность связывания с ферментом, %[1]	Ферментативная активность после конъюгации, % от исходной	Функциональные группы, участвующие в реакции связывания
КГС	40	8	Аминогруппы
КГС-МБ	96	100	Сульфгидрильные группы
К-МБ	97	100	То же

[1]) Связывание антител с ферментом контролировали методом осаждения вторыми антителами при избытке антител против кортизола.

В случае ИФА кортизола для конъюгации гаптена с сульфгидрильными группами β-галактозидазы были синтезированы производные кортизола — КГС-МБ и К-МБ. С целью сравнения нашего метода конъюгации с разработанными ранее мы проводили также связывание КГС с аминогруппами β-галактозидазы методом смешанных ангидридов. Сравнение полученных конъюгатов проводили методом осаждения вторыми антителами при избытке антител против кортизола. Установлено, что при использовании метода смешанных ангидридов метится только 40% молекул фермента, при этом ферментативная активность снижается на 20%. При использовании разработанного нами метода конъюгации с производными гаптена без заметного снижения ферментативной активности метится более 95% фермента (табл. 17-1). Число молей КГС-МБ или К-МБ, связанных с ферментом, непосредственно не определяли. Однако, как и в случае конъюгата [T_4 — фермент], можно считать, что с каждой молекулой β-галактозидазы связывается до 12 молекул гаптена. Изучали также иммунологическую активность и специфичность взаимодействия конъюгатов [гаптен — фермент] с антисывороткой против кортизола. Конъюгаты типа [КГС—β-галактозидаза] и [КГС-МБ—β-галактозидаза] обладают высокой иммунологической активностью, но лишь в незначительной степени вытесняются из комплекса с антителами

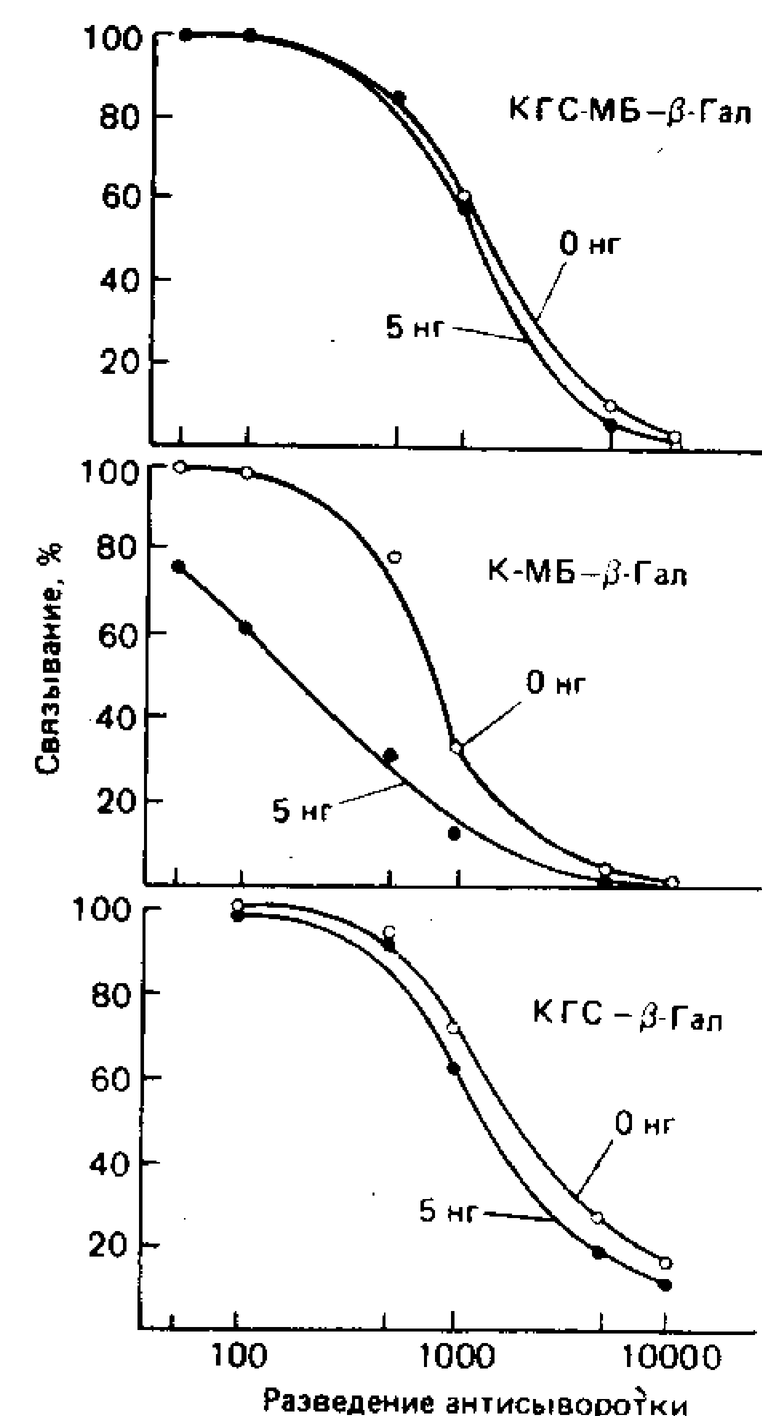


Рис. 17-3. Кривая разведения антисыворотки против кортизола с использованием в качестве маркеров [К-МБ-β-галактозидаза], [КГС — β-галактозидаза], [КГС-МБ — β-галактозидаза] с добавлением (5 нг) либо без добавления кортизола (0 нг).

при добавлении 5 нг кортизола. Что касается конъюгата [К-МБ-β-галактозидаза], то наряду с высокой иммунологической активностью для него оказалась характерна способность эффективно вытесняться из иммунокомплекса в присутствии кортизола (рис. 17-3). Перекрестная активность по отношению к другим стероидам, определенная методом Абрахама (Abraham, 1969), составила 150% для кортизол-21-ацетата, 10% для кортизона, 7% для кортикостерона и менее 0,1% для 11-дезоксикортизола, 17-гидроксипрогестерона, преднизолона и дексаметазона. Эти иммунохимические свойства однозначно свидетельствуют о том, что К-МБ был этерифицирован в 21-м положении *м*-малеимидобензоильной группой. Типичные стандартные кривые для ИФА и РИА кортизола приведены на рис. 17-4. Эффективное тестирование можно проводить в диапазоне 1—50 мкг/дл с использованием образцов объемом 20 мкл. Максимальная чувствительность — 1 мкг/дл была определена при $B/B_0=90\%$. При определении методом ИФА уровня кортизола в серийных разведениях плазмы ($n=3$) с различным содержанием кортизола (рис. 17-5) была установлена линейная зависимость между концентрацией кортизола и разведением образца. Для определения корреляции ИФА и РИА измеряли уровень кортизола в 24 образцах плазмы. Между значениями уровня кортизола, определенными обоими методами, наблюдалась хорошая корреляция ($y=0,93\,x+0,42$, $r=0,99$, $n=24$).

Для ИФА дигоксина осуществляли связывание малеимидного производного дигоксигенин-3-О-сукцината с β-галактозидазой. При этом с производным гаптена связывалось около 97% фермента. После завершения реакции конъюгации снижения ферментативной активности не наблюдалось. Результаты, полученные в случае ИФА дигоксина, сходны с результатами тестирования других гаптенов. Антисыворотку разводили в 5000 раз и 0,1 мл разведенного раствора использовали для стандартного анализа. При проведении ИФА с вытеснением

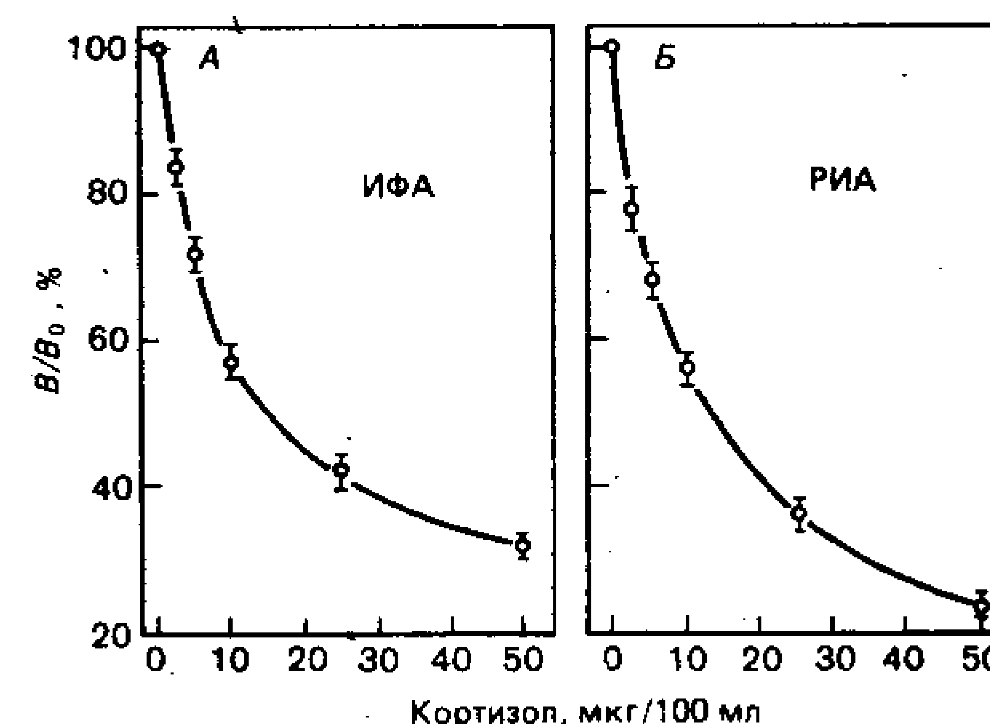


Рис. 17-4. Стандартные кривые для анализа кортизола методом ИФА (*А*) и РИА (*Б*). Каждая точка представляет среднее значение шести повторных измерений [± стандартное отклонение (*S*)].

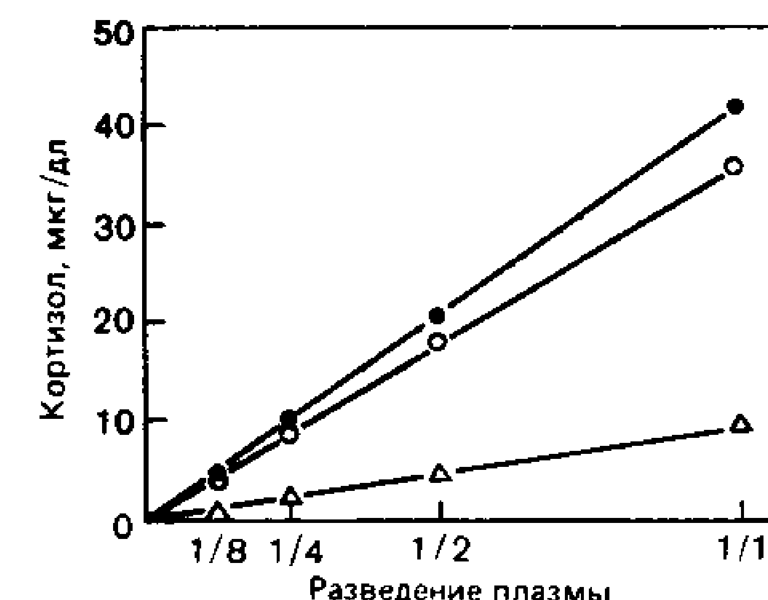


Рис. 17-5. Концентрация кортизола в различных разведениях образцов плазмы.

немеченым дигоксином максимальная чувствительность анализа в диапазоне 0—5 нг/мл соответствует 0,6 нг/мл при значении коэффициента вариации ~3% (рис. 17-6). Таким образом, использованный нами метод, основанный на применении иммобилизованных вторых антител, давал достоверные и воспроизводимые результаты. При проверке на способность вступать в перекрестные реакции с дигоксигенином и диготоксином были получены значения 142% и 3,8% соответственно, которые свидетельствуют о том, что ИФА специфичен для дигоксина и что дигоксигенин действительно сукцинируется в положении 3. В описанных ранее методиках конъюгация фермента с углеводсодержащим гаптеном была основана на ковалентном присоединении ε-аминогрупп лизина фермента к концевым углеводным остаткам с образованием шиффовых оснований и последующим восстановлением их $NaBH_4$ (Lauer, Erlanger, 1974). Эта процедура довольно громоздка и трудна в исполнении. Наш метод связывания гаптена с β-галактозидазой благодаря вовлечению в реакцию конъюгации с гаптеном сульфгидрильных групп фермента прост и легко воспроизводим.

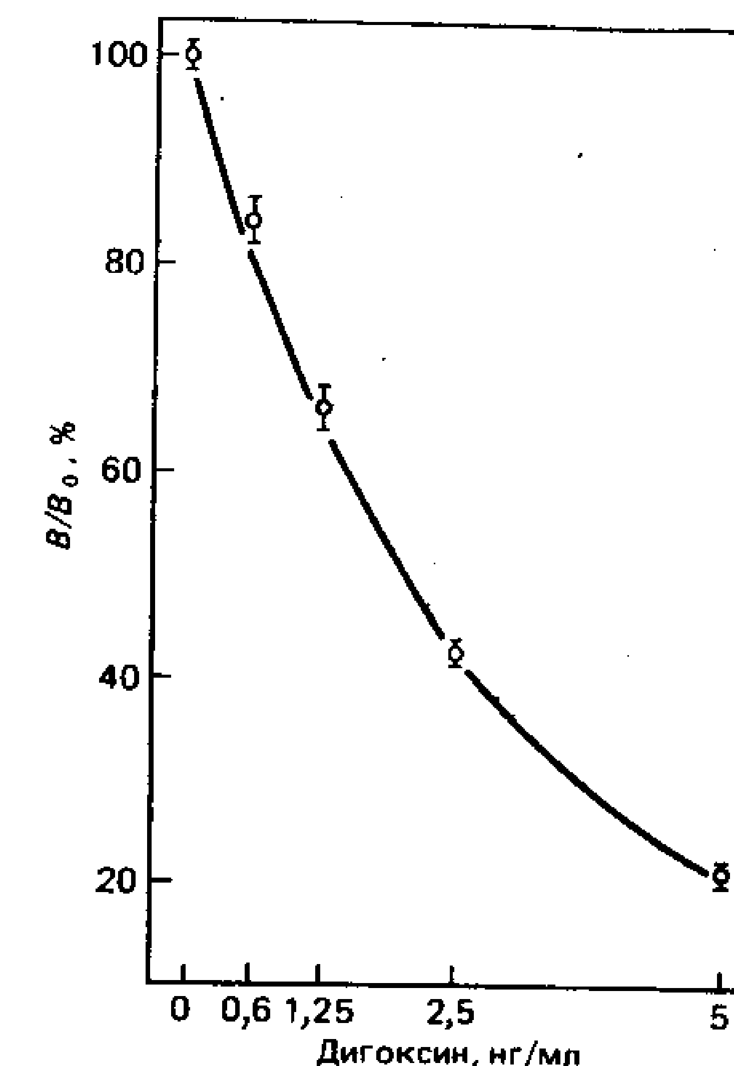


Рис. 17-6. Стандартная кривая для определения дигоксина с помощью иммуноферментного анализа.

Литература

Abraham G. E. (1969). Solid phase radioimmunoassay of estradiol-17 beta, J. Clin. Endocrinol. Metab., 29, 866—870.
Ashley H. N., Harington C. R. CLXXIX (1929). Some derivatives of thyroxin xine, Biochem. J., 22, 1436—1439.
Comoglio S., Celada F. (1976). An immuno-enzymatic assay of cortosol using E. coli-galactosidase as labes, J. Immunol. Methods, 10, 161—170.
Dray F., Andrieu J. F., Renaud F. (1975). Enzyme immunoassay of progesterone at the picogram level using-galactosidase as label, Biochem. Biophys. Acta, 403, 131—138.
Gharib H., Ryan R. J., Mayberry W. E., Hackert T. (1971). Radioimmunoassay for triiodothyronine (T_3): Affinity and specificity of the antibody to T_3, J. Clin. Endocr., 33, 509—518.
Grassetti D. K., Murray J. F., Jr. (1967). Determination of sulfhydryl groups with 2,2′- or 4,4′-dithiodipyridine, Arch. Biochem. Biophys., 119, 41—49.
Ishikawa E. (1983). Enzyme-labeling of antibodies, J. of Immunoassay 3, 209—327.
Jorwall H., Fowler A. V., Zabin I. (1978). Probe of -galactosidase — Structure with iodoacetate; Differential reactivity of thiol groups in wild type and mutant forms of -galactosidase, Biochemistry, 17, 5160—5168.
Lauer R. C., Erlanger B. F. (1974). An enzyme-immunoassay of antibody specific for adenosine using-galactosidase, Immunochemistry, 11, 533—540.
Monji N., Ali H., Castro A. (1980a). Quantification of digoxin by enzyme immunoassay: synthesis of a maleimide derivative of digoxigenin succinate for enzyme coupling, Experientia, 36, 1141—1142.
Monji N., Gomez N. O., Kawashima H., Ali H., Castro A. (1980b). Practical enzyme immunoassay for plasma cortisol using-galactosidase as enzyme label, J. Clin. Endocr. Metab., 50, 355—359.
Monji N., Malkus H., Castro A. (1978). Maleimide derivative of hapten for coupling to enzyme: a new method im enzyme immunoassay, Biochem. Biophys. Res. Commun., 85, 671—677.
Oliver G. C., Jr., Parker B. M., Brasfield D. L., Parker C. W. (1968). The measurement of digitoxin in human serum by radioimmunoassay, J. Clin. Invest., 47, 1035—1042.
La Parola G. (1934). Azione dell'anidride maleica sulle lasi aldeido cumminiche, Gazz. chim. Ital., 64, 919—925.
Ruder H. J., Robert L. G., Lippett M. B. (1972). A radioimmunoassay for cortisol in plasma and urine, J. Clin. Endocrinol. Metab., 35, 219—224.
Searle N. E., Juli 6, (1948). United States Patent No. 2,444,536, Synthesis of N-aryl-maleimides.
Smith T. W., Butler V. P., Jr., Haber E. (1970). Characterization of antibodies of high affinity and specificity for the digitalis glycoside digoxin, Biochemistry, 9, 331—337.
Wallenfels K., Muller-Hill B., Dabich D., Streffer C., Weil R. (1964). Untersuchungen an milchzuckerspaltenden Enzymen, XVI Zahl und Reactivität der SH-Gruppen der -galaktosidase aus E. coli, Biochem. Z., 340, 4[illegible]—47.

Глава 18

Иммуноферментный анализ с использованием дополнительно маркированных конъюгатов фермент — лиганд

Т. Т. Нго и Г. М. Ленхофф

Введение

Мы разработали новый подход к разделению компонентов в ИФА, основанный на применении конъюгатов [фермент — лиганд], дополнительно маркированных введением в их состав своего рода «якорных» молекул (tag molecules). Такой подход отличается от основных вариантов ИФА, для которых процесс разделения, как правило, зависит от взаимодействий между лигандом (антигеном) и антителом, причем один из двух компонентов иммобилизован на матрице (Schuurs, Van Weemen, 1977; Pal, 1978; Engvall, Pesce, 1978; Borrebaeck, Mattiasson, 1979; Ngo, Lenhoff, 1982).

В предложенном нами методе индикаторный фермент связан с лигандом и с дополнительной якорной молекулой, способной образовывать прочный комплекс с соответствующим специфическим рецептором, иммобилизованным на твердой подложке. Этот метод можно назвать иммуноферментным анализом с применением принципа «блокирование якорных молекул при взаимодействии с антителами» (ИФАЯМ, или AMETIA от англ. Antibody Masking the Enzyme-Tag Immunoassay). В описываемой в этой главе модельной системе в роли лиганда выступает ДНФ-лизин, в роли индикаторного фермента — β-галактозидаза, в роли якоря — биотин, в роли иммобилизованного рецептора (ИР) — авидин, ковалентно связанный с сефарозой.

Принцип метода

1) В гомогенной реакционной смеси происходит конкуренция между свободным (тестируемым) лигандом (Л) и тройным конъюгатом [лиганд — фермент — якорь (Л—Ф—Я)] за связывание с антителами (Ат) к лиганду (реакции *I* и *II* на рис. 18-1).

2) К реакционной смеси добавляют сорбент, с которым связан специфически взаимодействующий с якорными молекулами иммобилизованный рецептор (ИР). После перемешивания и кратковременной инкубации суспензию центрифугируют для разделения молекул конъюгата, не прореагировавших с антителами и образовавших нерастворимый комплекс с иммобилизованным рецептором (Л—Ф—Я : ИР, реакция *III*), и молекул

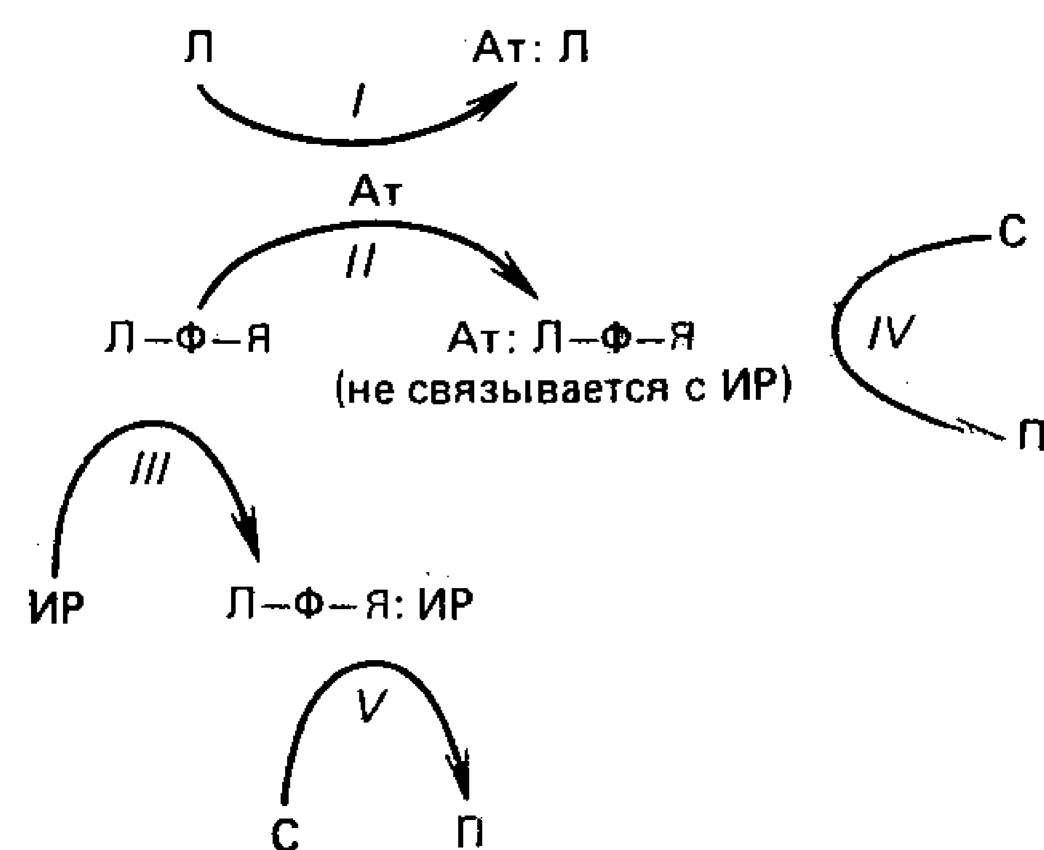


Рис. 18-1. Схема реакций.

конъюгата, образовавших комплекс с содержавшимися в растворе антителами (Ат : : Л—Ф—Я). Якорные молекулы в составе комплекса Ат : : Л—Ф—Я не способны взаимодействовать с рецептором.

3) Измеряют ферментативную активность или в супернатанте, содержащем Ат : : Л—Ф—Я, или в осадке, содержащем комплекс Л—Ф—Я : ИР (реакции *IV* и *V* соответственно).

При анализе методом ИФАЯМ используют фиксированные концентрации компонентов [Л—Ф—Я], Ат и ИР. Количество свободного [Л—Ф—Я], способного связываться с ИР, зависит от количества тестируемого лиганда (Л), поскольку Л и [Л—Ф—Я] конкурируют за связывание со свободными антителами (реакции *I* и *II*), т. е. чем ниже концентрация Л, тем больше доля антител, участвующих в связывании [Л—Ф—Я], и тем соответственно меньше доля молекул конъюгата, способных взаимодействовать с ИР (по реакции *III*). Образование комплекса Ат : Л—Ф—Я (реакция *II*) делает остаток якорной молекулы (Я) недоступным для связывания с ИР, вероятно, за счет пространственных затруднений, обусловленных маскирующим эффектом крупных молекул Ат, входящих в состав комплекса.

Таким образом, при проведении анализа методом ИФАЯМ низкой концентрации тестируемого компонента соответствует высокая активность индикаторного фермента, остающегося в свободной фазе (реакция *IV*), и низкая активность фермента, связавшегося с сорбентом. Напротив, при более высокой концентрации компонента Л в образце с ним будет связываться бо́льшее количество Ат (реакция *I*), позволяя тем самым бо́льшему количеству конъюгата [Л—Ф—Я] образовать комплекс с ИР (реакция *III*). В результате будет наблюдаться более высокая активность фермента в комплексе с твердым носителем и более низкая в свободной жидкости.

Материалы и методы

Реактивы: 2,4-динитрофенил-ε-лизин, *о*-нитрофенил-β-D-галактопиранозид и авидин (Sigma); β-галактозидаза *E. coli* (Boehringer Mannheim); АН-сефароза (Pharmacia); кроличья антисыворотка против ДНФ-групп (Miles Labs., Inc.); гидроксисукцинимид-(*м*-малеимидо)бензоат (Pierce).

Иммобилизация авидина на аминогексил-сефарозе (АН-сефарозе)

Иммобилизацию авидина осуществляли при участии в роли сшивающего агента глутарового альдегида. Порцию промытой АН-сефарозы (10 мл) суспендировали в 400 мл 5%-ного раствора глутарового альдегида в 0,2 М $NaHCO_3$, pH 8,5, перемешивали 1 ч при комнатной температуре, а затем последовательно промывали 0,5 М NaCl (0,5 л) и 0,1 М $NaHCO_3$, pH 8,5, (0,5 л). Суспендировали активированный таким образом носитель в 5 мл раствора, содержащего 50 мг авидина в 0,1 М $NaHCO_3$, pH 8,5, перемешивали 1 ч при комнатной температуре и еще 20 ч при 4 °С. Последовательно промывали готовый сорбент 0,5 М NaCl на 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 8,0, (1 л) и затем 0,1 М Na-фосфатным буфером, pH 8,0 (1 л). Включение авидина составляло около 13 мг на 10 мл влажного сорбента.

Синтез *м*-малеимидобензоил-ДНФ-лизина

К 2 мл смеси тетрагидрофуран — диметилформамид (1 : 1) добавляли по 10 мкмоль N-гидроксисукцинимидного эфира *м*-малеимидобензойной кислоты и ДНФ-лизина и 11 мкмоль Na_2CO_3. Смесь перемешивали при комнатной температуре. Реакция завершалась за 24 ч.

Получение конъюгата [β-галактозидаза — биотин]

Раствор β-галактозидазы диализовали против 0,1 М Na-фосфатного буфера, pH 8,0. К 2 мл диализованного раствора, содержащего 2,8 нмоль фермента, добавляли 281 нмоль N-гидроксисукцинимидного производного биотина в 0,1 мл диметилсульфоксида. Перемешивали 3 ч при комнатной температуре и 5 ч при 4 °С и затем диализовали при 4 °С.

Модификация конъюгата [биотин — β-галактозидаза] *м*-малеимидобензоил-ДНФ-лизином

К 1 мл раствора биотинилированного фермента (1,5 нмоль) добавляли 0,2 мл *м*-малеимидобензоил-ДНФ-лизина (1 мкмоль) и перемешивали 2 ч при комнатной температуре. Избыток непрореагировавшего *м*-малеимидобензоил-ДНФ-лизина отделяли гель-фильтрацией на колонке (2×45 см) с сефадексом G-50, используя в качестве элюирующего раствора 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,2.

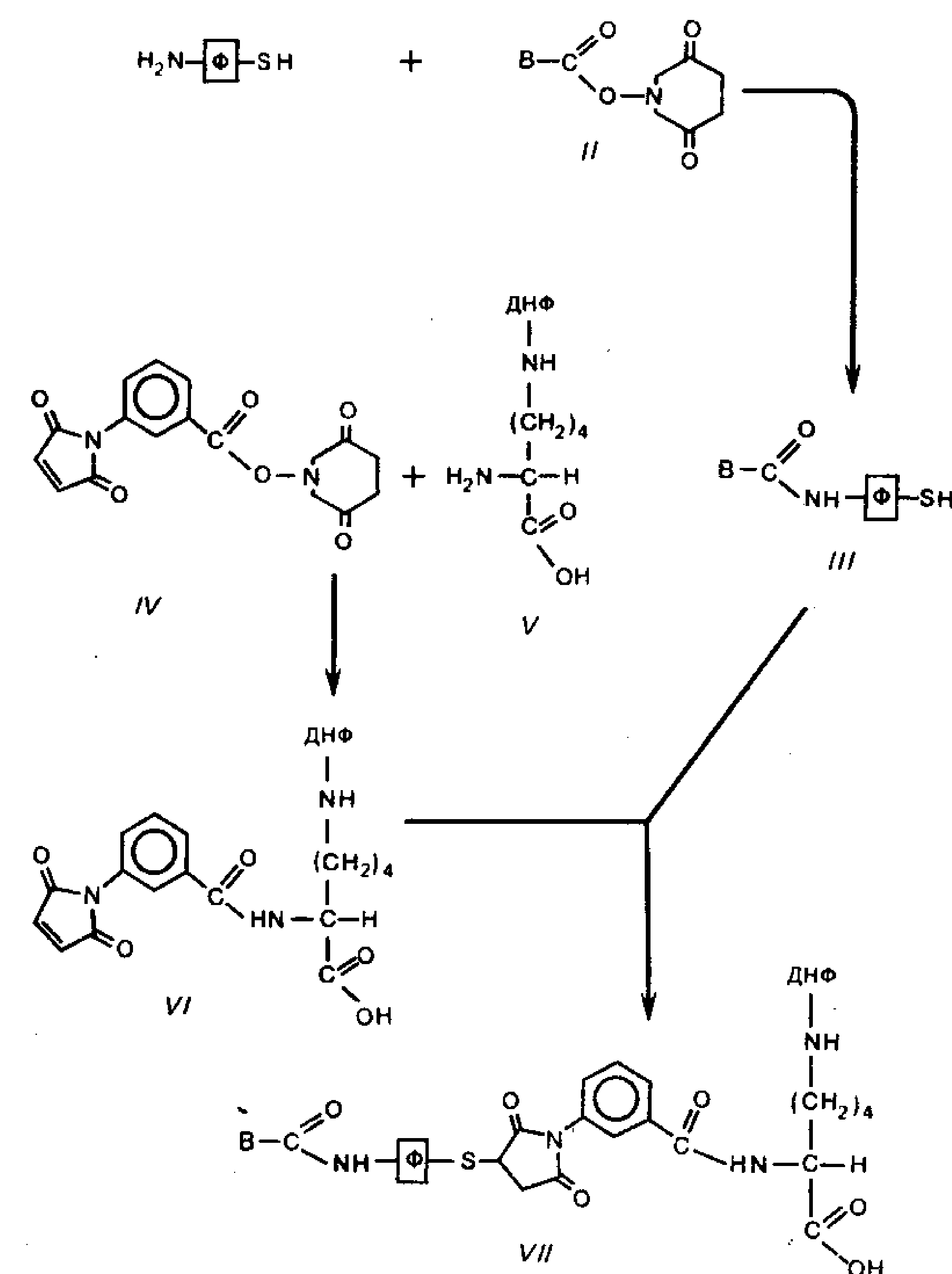


Рис. 18-2. Химические реакции в схеме получения конъюгата [β-галактозидаза — ДНФ-лизин — биотин]. *I* — β-галактозидаза; *II* — N-гидроксисукцинимидное производное биотина; *III* — биотинил-β-галактозидаза; *IV* — N-гидроксисукцинимидный эфир *м*-малеимидобензойной кислоты; *V* — ДНФ-лизин; *VI* — *м*-малеимидобензоил-ДНФ-лизин; *VII* — β-галактозидаза, меченная биотином и ДНФ-лизином.

Ферментативная активность

Для определения активности β-галактозидазы в свободной жидкости или в комплексе с сорбентом в качестве субстрата использовали *о*-нитрофенил- β -галактопиранозид (Ngo et al., 1976).

Типичные результаты

Получение модельного конъюгата [Л — Ф — Я]

На рис. 18-2 показаны химические реакции, приводящие к получению β-галактозидазы (Ф), связанной с биотином (используется в качестве якоря) и ДНФ-лизином (лиганд). Фермент (*I*), содержащий свободные амино- и тиогруппы, реагирует с активированным биотином, которым является его N - гидроксисукцинимидное производное (II). Образующийся при этом биотинилфермент (*III*) реагирует с *м*-малеимидобензоил-ДНФ-лизином (*VI*), полученным при взаимодействии N-гидроксисукцинимидо-(*м*-малеимидо)-бензоата (*IV*) с ДНФ-лизином (*V*). Конечный продукт — дополнительно маркированный конъюгат [фермент — лиганд] (*VII*) содержит, таким образом, β-галактозидазу, связанную как с ДНФ-лизином (*VI*) через остаток малеимидобензоата, так и с биотиновым якорем. В полученных нами препаратах на каждую молекулу фермента в конъюгате приходилась 21 молекула связанного биотина и 37 молекул ДНФ-лизина.

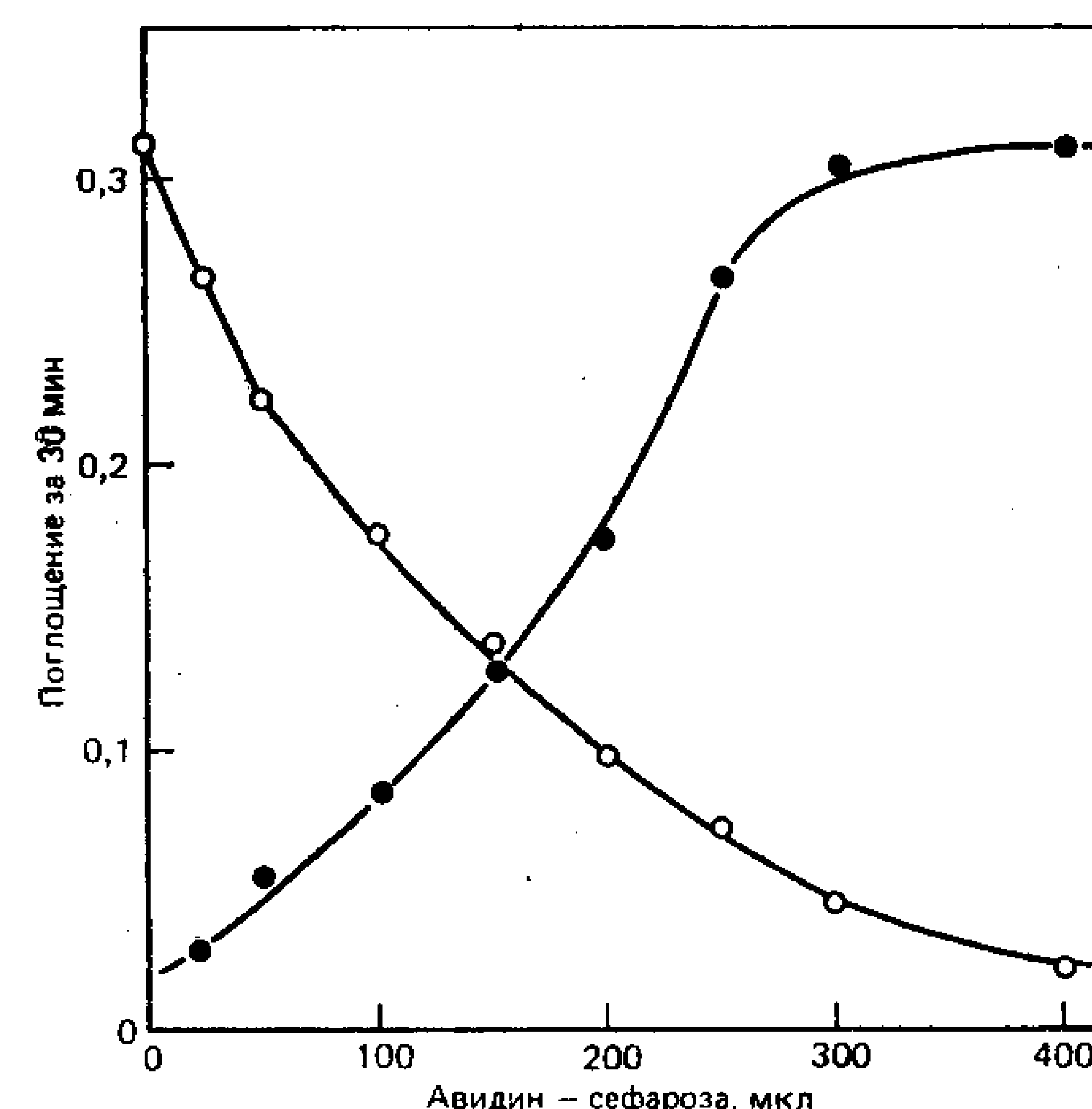


Рис. 18-3. Связывание конъюгата [ДНФ-лизин — β-галактозидаза — биотин] с авидин-сефарозой. К 200 мкл раствора конъюгата (1,36 нмоль) добавляли различные количества 10%-ной суспензии сорбента. Доводили объем смеси до 600 мкл 0,5%-ным раствором желатины в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,2, инкубировали 30 мин при 25 °C и центрифугировали 5 мин на микроцентрифуге «Эппендорф». В надосадочной жидкости (500 мкл) определяли активность β-галактозидазы по расщеплению хромогенного субстрата *о*-нитрофенил-β-галактопиранозида (светлые кружки). Осадки трижды промывали, суспендируя их в 1 мл 0,5%-ного раствора желатины, 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,2, с последующим 5-минутным центрифугированием. Определяли ферментативную активность, суспендируя осадки в 3 мл раствора субстрата (темные кружки). Все ферментативные реакции проводили при 25 °C в течение 30 мин.

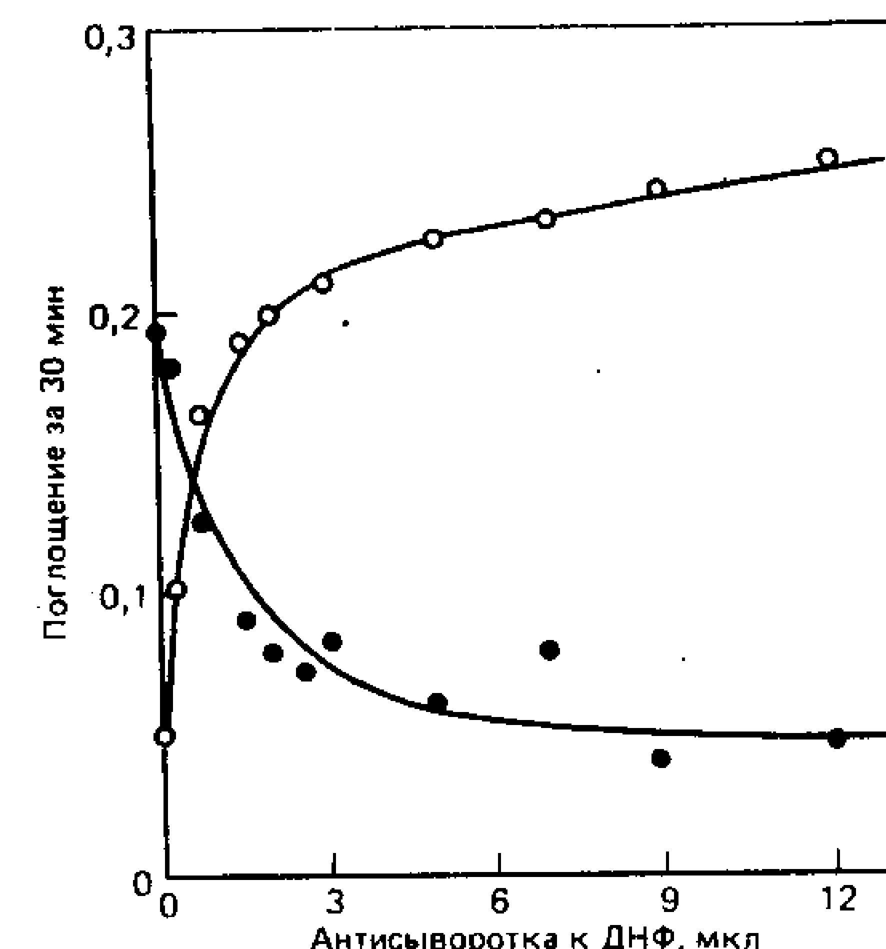


Рис. 18-4. Антитела против ДНФ-лизина препятствуют связыванию конъюгата [ДНФ-лизин — β-галактозидаза — биотин] с авидин-сефарозой. К 200 мкл раствора конъюгата (1,36 нмоль) добавляли различные количества препарата ДНФ-специфической антисыворотки. Объем смеси доводили до 600 мкл и добавляли фиксированные количества 10%-ной суспензии авидин-сефарозы (400 мкл). Инкубировали 30 мин при 25 °C и центрифугировали в течение 5 мин. В супернатантах (800 мкл) определяли ферментативную активность (светлые кружки). Осадки трижды промывали и определяли в них активность фермента (темные кружки), как описано для рис. 18-3.

Взаимодействие растворимого [Л — Ф — Я] с иммобилизованным рецептором (ИР)

При добавлении к раствору с фиксированной концентрацией [Л—Ф—Я] нарастающих количеств сорбента ИР активность фермента в растворе постепенно убывает, а активность в нерастворимой фракции, содержащей авидин-сефарозу, возрастает (рис. 18-3), что соответствует изображенной на рис. 18-1 реакции *III*.

Подавление ферментативной активности конъюгата [Л — Ф — Я] при связывании с антителами

При добавлении фиксированных количеств авидин-сефарозы (ИР) к серии растворов, содержащих фиксированные количества конъюгата [Л—Ф—Я] и возрастающие количества ДНФ-специфичной антисыворотки (Ат), наблюдали повышение ферментативной активности в свободной жидкости и понижение активности в нерастворимой фракции (рис. 18-4). Это означает, что: 1) антитела связываются с ДНФ-группами (Л), входящими в состав конъюгата [Л—Ф—Я], и 2) биотиновые якорные остатки (Я), входящие в состав комплекса Ат : Л—Ф—Я, утрачивают способность к взаимодействию с авидин-сефарозой (ИР), вероятно, за счет маскирующего эффекта связанных антител.

Стандартная кривая: конкуренция между Л и [Л — Ф — Я] за связывание с Ат

Остатки ДНФ-лизина, входящие в состав конъюгата [Л—Ф—Я], способны эффективно конкурировать с тестируемым свободным ДНФ-лизином (Л) за связывание с соответствующими антителами (Ат). При добавлении возрастающих количеств свободного Л к фиксированному количеству конъюгата [Л—Ф—Я] и проведении анализа с использованием постоянных количеств антител (Ат) и авидин-сефарозы (ИР) наблюдали постепенное уменьшение ферментативной активности в супернатанте (Л—Ф—Я : Ат) и адекватное возрастание активности в нерастворимой фракции (Л—Ф—Я : ИР) (рис. 18-5). Судя по

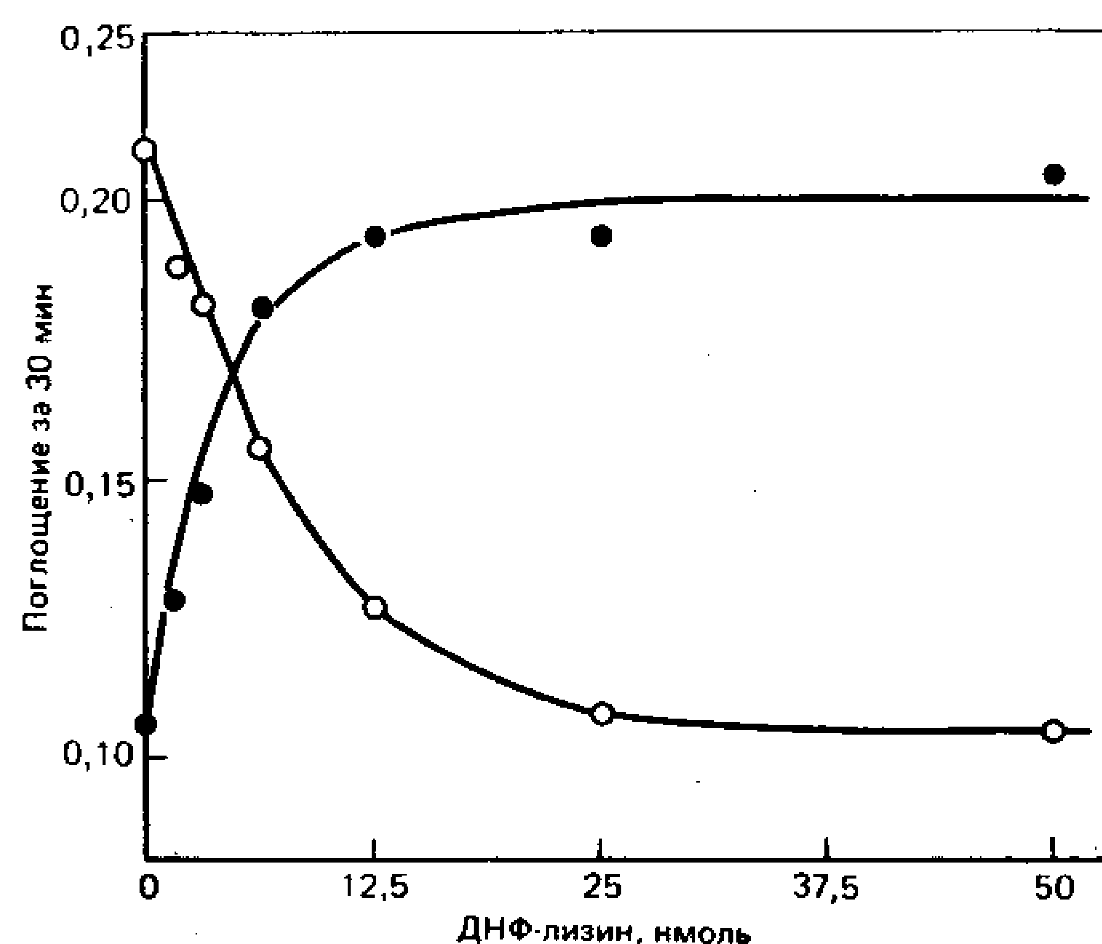


Рис. 18-5. Стандартная кривая для тестирования ДНФ-лизина с помощью метода ИФАЯМ. К 200 мкл раствора с фиксированным содержанием конъюгата [ДНФ-лизин — β-галактозидаза — биотин] (1,36 нмоль) добавляли по 100 мкл раствора с различным содержанием свободного ДНФ-лизина. К смесям добавляли по 0,5 мкл ДНФ-специфической антисыворотки и по 500 мкл 10%-ной суспензии авидин-сефарозы. Инкубировали 30 мин при 25 °С и центрифугировали 5 мин. В супернатантах (800 мкл) определяли активность фермента (светлые кружки). Осадки трижды промывали и определяли в них активность (темные кружки), как описано для рис. 18-3.

всему, конкуренция свободного ДНФ-лизина с остатками ДНФ-лизина конъюгата [Л—Ф—Я] приводит к тому, что в реакционной смеси повышается содержание конъюгата, не связанного с антителами, и поэтому способного адсорбироваться на иммобилизованном рецепторе с образованием нерастворимого комплекса Л—Ф—Я : ИР.

Было показано, что таким способом можно количественно тестировать свободный ДНФ-лизин в диапазоне концентраций 1—25 мкМ (рис. 18-5).

Влияние эндогенного биотина

Присутствие в тестируемом образце биотина, который является естественным компонентом многих биологических систем, в концентрации, заметно превышающей норму, может существенно снизить точность определения описанным методом. Эндогенный (сывороточный) биотин будет препятствовать связыванию [Л—Ф—Я] с ИР (если в качестве Я используется именно биотин) благодаря конкуренции за связывание с авидин-сефарозой. Так, повышенное содержание биотина может быть характерно, например, для сыворотки больных с дефицитом по голокарбоксилазе, получающих терапевтические дозы биотина (Roth et al., 1981).

Обсуждение

Данные, полученные на модельной системе и представленные на рис. 18-3—18-5, подтверждают принципы, положенные в основу метода ИФАЯМ. Метод по существу представляет собой вариант иммуноферментного анализа с разделением компонентов, в котором связывание антител с лигандом, входящим в состав конъюгата [лиганд — фермент — якорь], препятствует взаимодействию якорных остатков конъюгата с иммобилизованным рецептором. С последним связывается только избыток свободного конъюгата, что позволяет удалить его из раствора и отдельно протестировать содержание ферментной метки как в растворе, так и в нерастворимой фракции.

Отличительные особенности метода

Все описанные на сегодняшний день варианты гетерогенного иммуноферментного анализа (Borrebaeck, Mattiasson, 1979; Engvall, Pesce, 1978; Pal, 1978; Schuurs, Van Weemen, 1977) основаны на: а) образовании комплекса антитела с антигеном (лигандом) и б) отделении этого комплекса от избытка свободных компонентов с использованием иммобилизованных антител, антигена или лиганда. Принципиальное отличие метода

ИФАЯМ заключается в том, что этап разделения свободных и связанных компонентов основан не на взаимодействии антиген — антитело. В этом варианте ИФА антитела одновременно: а) специфически связываются с тестируемым лигандом (Л) и с его производным, входящим в состав конъюгата [Л—Ф—Я], и б) при связывании с [Л—Ф—Я] маскируют остатки якорных молекул (Я) конъюгата. Этап разделения реакционной смеси в методе ИФАЯМ основан на способности конъюгата [Л—Ф—Я], не связавшегося с антителами, взаимодействовать с иммобилизованным рецептором (ИР) с образованием нерастворимого комплекса (Л—Ф—Я : ИР). Доля молекул конъюгата, которая оказалась связана с антителами (Ат : Л—Ф—Я), утрачивает способность взаимодействовать с ИР и, таким образом, остается в растворе.

Если в известных вариантах гетерогенного ИФА (Borrebaeck, Mattiasson, 1979; Engvall, Pesce, 1978; Engvall, Perlmann, 1971; Pal, 1978; Schall et al., 1978; Van Weemen, Schuurs, 1971, 1972, 1974; Van Hell et al., 1979) на этапе разделения с носителем неизбежно связываются те молекулы конъюгата [фермент — лиганд], которые образуют комплекс с антителами, то в ИФАЯМ, напротив, с носителем взаимодействуют только свободные молекулы конъюгата, не связанные с антителами. Другая особенность, отличающая метод ИФАЯМ от остальных вариантов конкурентного гетерогенного ИФА, заключается в том, что при низких концентрациях тестируемого компонента доля конъюгата, связывающегося с носителем, возрастает с ростом концентрации этого компонента. Отсюда следует, что стандартная кривая титрования в методе ИФАЯМ характеризуется положительным наклоном (см. рис. 18-5, *темные кружки*), а не отрицательным, как в случае традиционных вариантов ИФА с разделением (Schall et al., 1978; Van Hell et al., 1974).

В качестве якорных могут использоваться и молекулы, отличные от биотина, если доступны также соответствующие рецепторные молекулы, обладающие достаточно высоким сродством. Непревзойденным преимуществом использования системы биотин — авидин является необычайно высокое взаимное сродство ее компонентов (Green, 1975). В качестве якоря в состав конъюгатов [Л—Ф—Я] можно вводить и собственно авидин, а в роли своего рода молекулярного «крюка» для «вылавливания» таких конъюгатов использовать иммобилизованный биотин.

Возможности применения и модификации

Используемый в методе ИФАЯМ иммобилизованный рецептор является универсальным компонентом, поскольку с его помощью можно построить систему ИФА самых разнообразных лигандов с теми же самыми якорными молекулами в составе ферментного конъюгата. Этап центрифугирования можно заменить использованием колонок с иммобилизованным рецептором, а также пробирок или крупных гранул, покрытых слоем иммобилизованного рецептора. Вместо индикаторного фермента можно использовать флуоресцентную метку. Для этого, например, следует синтезировать конъюгат, в котором к некоему растворимому носителю будут присоединены молекулы лиганда, якоря и флуоресцирующего красителя.

Ограничения

Препятствием к широкому распространению метода ИФАЯМ в его разработанном на сегодня варианте является принципиальная необходимость проведения стадии разделения и сравнительно высокая стоимость авидина.

Краткое содержание

Описан новый подход к ИФА с разделением компонентов реакционной смеси, основанный на применении ферментных конъюгатов, в состав которых помимо лиганда введены якорные молекулы. Нерастворимой фазой (сорбентом) при этом служит иммобилизованный на носителе рецептор, специфически связывающийся с этими якорными молекулами. Антитела, образующие комплекс как со свободным (тестируемым) лигандом, так и с лигандом в составе конъюгата, связываясь с конъюгатом, маскируют входящие в его состав якорные молекулы. В результате взаимодействия с антителами молекулы конъюгата утрачивают способность связываться с иммобилизованным рецептором. Доля конъюгата, связанного с сорбентом, пропорциональна количеству тестируемого лиганда в пробе. Такая система разделения, основанная на эффекте маскирования якорных молекул при связывании с антителами, была названа ИФАЯМ.

В описанной модельной системе в качестве лиганда мы используем ДНФ-лизин, в качестве индикаторного фермента — β-галактозидазу, в качестве якоря — биотин, а в качестве нерастворимого рецептора — иммобилизованный на сефарозе авидин.

Литература

Borrebaeck C., Mattiasson B. (1979). Recent development in heterogeneous enzyme immunoassay, J. Solid Phase Biochem., 4, 57—67.
Engvall E., Perlmann P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin G, Immunochem., 8, 871—874.
Engvall E., Pesce A. J. (1978). Quantitative enzyme immunoassay, Scand. J. Immunol., 8, Suppl. 7.

Green N. M. (1975). Avidin. Adv. Prot. Chem., **29**, 85—113.
Ngo T. T., Lenhoff H. M. (1981). New approach to heterogeneous enzyme immunoassays using tagget enzyme-ligand conjugates, Biochem. Biophys. Res. Commun., **99**, 497—503.
Ngo T. T., Lenhoff H. M. (1982). Enzyme as versatile labels and signal amplifiers for monitoring immunochemical reactions, Mol. Cell. Biochem., **43**, 3—12.
Pal S. B. (Ed.), 1978. Enzyme Labeled Immunoassay of Hormones and Drugs, de Gruyter, Berlin, 475 pp.
Roth K. S., Allan L., Yang W., Foreman J. W., Dakshinamurti K. (1981). Serum and urinary biotin levels during treatment of holocarboxylase synthetase deficiency, Clin. Chim. Acta, **109**, 337—340.
Schall F. R., Jr., Fraser A. S., Hansen H. W., Kern E. W., Tenoso J. W. (1978). A sensitive manual enzyme immunoassay for thyroxine, Clin. Chem., **24**, 1801—1804.
Van Hell H., Brands J. A. M., Schuurs A. H. W. M. (1979). Enzyme-immunoassay of human placental lactogen, Clin. Chim. Acta, **91**, 309—316.
Van Weemen B. K., Schuurs A. H. W. M. (1971). Immunoassay using antigen-enzyme conjugates, FEBS Letters, **15**, 232—235.
Van Weemen B. K., Schuurs A. H. W. M. (1972). Immunoassay using hapten-enzyme conjugates, FEBS Letters, **24**, 77—81.
Van Weemen B. K., Schuurs A. H. W. M. (1974). Immunoassay using antibody-enzyme conjugates, FEBS Letters, **43**, 215—218.

Глава 19

Флуориметрические методы в иммуноферментном анализе

Кристин Милби

Введение

Чувствительность иммуноферментного анализа (ИФА) зависит от таких параметров, как 1) специфичность и авидность компонентов, образующих иммунокомплексы, 2) удельная активность индикаторного фермента и 3) предел чувствительности определения продукта ферментативной реакции. При оптимизации первых двух параметров фактором, определяющим чувствительность ИФА, оказывается третий, а именно возможность обнаружения продукта ферментативной реакции. Одним из наиболее простых и чувствительных количественных методов детектирования является флуориметрия. Чувствительность обычных колориметрических методов, как правило, ограничена концентрациями порядка 10^{-3} мкг/мл, в то время как флуориметрия может обеспечить чувствительность детектирования вещества вплоть до 10^{-6} мкг/мл, а использование лазерного возбуждения может еще снизить этот предел (Bradley, Zare, 1976; Imasaka, Zare, 1979). Принципиальное преимущество флуориметрии связано с тем, что в данном случае происходит регистрация увеличения сигнала при относительно слабой фоновой люминесценции, в то время как при колориметрии измеряется небольшое уменьшение сигнала при поглощении малой доли мощности светового потока. Так, с помощью флуоресцентной микроскопии удается обнаруживать даже отдельные молекулы фермента β-галактозидазы (Rotman, 1961). Однако в обычной ситуации чувствительность флуориметрического детектирования часто ограничивается уровнем фоновой флуоресценции, связанной с различными компонентами сыворотки или других тестируемых биологических проб. Поэтому флуориметрические варианты ИФА реально используются только для гетерогенных систем анализа, особенно в тех случаях, когда примеси из пробы удаляют с помощью иммобилизованных на носителе антител.

Флуориметрические ферментативные методы применяют с начала 60-х годов (Guilbault, 1968). При работе с некоторыми ферментами удается использовать изменение флуоресцентных свойств восстановленных пиридиндинуклеотидных коферментов, NADH и NADPH. В ряде случаев применяют синтетические субстраты, превращающиеся под действием ферментов в продукты с интенсивной флуоресценцией. Как будет показано на

рассмотренных ниже примерах, предел обнаружения индикаторных ферментов с использованием флуорогенных субстратов может быть на несколько порядков ниже, чем при использовании хромогенных субстратов. Такой выигрыш в чувствительности определения активности фермента может непосредственно приводить к значительному повышению чувствительности при иммуноферментном тестировании различных веществ. Повышение чувствительности позволяет также уменьшить объем тестируемой пробы, использовать более разбавленные реагенты и (или) менее продолжительные времена инкубации. Использование лазерного возбуждения флуоресценции в ИФА предоставляет еще более широкие возможности для повышения чувствительности, уменьшения расходов образца, реагентов и времени (Lidofsky et al., 1981; Hinsberg et al., 1981a; Hinsberg et al., 1981b).

Субстраты

При подборе флуорогенного субстрата следует учитывать несколько важных факторов. Субстрат должен быть достаточно стабилен и легко доступен в чистом виде. Сам по себе он не должен проявлять заметной флуоресценции в условиях определения продукта и не должен подвергаться существенной неферментативной деградации с образованием флуоресцирующих продуктов. Естественно, он должен быть хорошим субстратом для используемого индикаторного фермента. Продукт ферментативного превращения этого субстрата должен быть стабильным и сильно флуоресцирующим. Регистрация флуоресценции облегчается при наличии большого стоксова смещения, т. е. тогда, когда различие между длинами волн максимумов возбуждения и испускания достаточно велико. Выгодно работать с веществами, имеющими достаточно длинноволновый максимум возбуждения, поскольку в этом случае наблюдается гораздо менее интенсивная фоновая флуоресценция благодаря понижению энергии возбуждения.

В ИФА с флуориметрическим детектированием нашли применение три фермента — β-галактозидаза (КФ 3.2.1.23), щелочная фосфатаза (КФ 3.1.3.1) и пероксидаза хрена (КФ 1.11.1.7). Наиболее распространенные для каждого из них флуорогенные субстраты, а также флуоресцентные свойства соответствующих продуктов приведены в табл. 19-1. Структурные формулы изображены на рис. 19-1.

При выборе между щелочной фосфатазой и β-галактозидазой авторы двух работ (Ishikawa, Kato, 1978; Neurath, Strick, 1981) отдали предпочтение второму ферменту, несмотря на то что удельная активность β-галактозидазы по расщеплению 4-метилумбеллиферил-β-D-галактозида (4-МУГ) ниже, чем ак-

Таблица 19-1. Фермент-субстратные системы, используемые во флуориметрическом ИФА

Фермент	Субстрат	Продукт	λ_{max} возбуждения, нм	λ_{max} испускания, нм	Относительная интенсивность сигнала[1)]
β-Галактозидаза	4-Метилумбеллиферил-β-D-галактозид	4-Метилумбеллиферон	360	450	10[2)]
Щелочная фосфатаза	4-Метилумбеллиферилфосфат	4-Метилумбеллиферон	360	450	10[2)]
Пероксидаза хрена	*п*-Гидроксифенилуксусная кислота	Димер[3]	317	414	0,03[4)]

[1)] Отношение значений коэффициентов флуоресценции продукта и хининсульфата, определенных на одном и том же приборе.
[2)] Yolken, Stopa, 1979.
[3)] См. рис. 19-1.
[4)] Guilbault et al., 1968.

тивность фосфатазы в отношении 4-метилумбеллиферилфосфата (4-МУФ). В обеих работах отмечено, что фоновая флуоресценция для 4-МУФ значительно выше, чем в случае 4-МУГ. Возможно, это связано с неферментативным гидролизом 4-МУФ (Neurath, Strick, 1981), и тогда этот недостаток можно устранить дополнительной очисткой и хранением без доступа влаги.

Като и др. (Kato et al., 1975a) в качестве субстратов для β-галактозидазы использовали как 4-МУГ, так и флуоресцеинди-(β-D-галактопиранозид). С обоими субстратами были получены сходные результаты, однако для дальнейшей работы авторы выбрали 4-МУГ (Ishikawa, Kato, 1978).

Для щелочной фосфатазы, используемой в качестве индикаторного фермента, было проведено сравнение трех флуорогенных и одного хромогенного субстратов (Yolken, Stopa, 1979). Наилучшие результаты были получены при работе с 4-МУФ, позволяющим обнаружить до $5 \cdot 10^{-19}$ моль фермента за 100 мин инкубации. Хромогенный субстрат *п*-нитрофенилфосфат в тех же условиях дает возможность обнаружить лишь $5 \cdot 10^{-17}$ моль фермента. Чувствительность определения фосфатазы по двум другим субстратам — флавон-3-дифосфату и 3-О-метилфлуоресцеинфосфату — ниже, чем в случае 4-МУФ, но выше, чем по хромогенному субстрату.

Для пероксидазы хрена было опробовано множество флуорогенных субстратов (Guilbault et al., 1968). Из них для флуориметрического ИФА реально используются тирамин, гомованилиновая кислота, *п*-гидроксифенилуксусная кислота (ГФК) и *п*-гидроксифенилпропионовая кислота. Наиболее популярным субстратом стала ГФК благодаря своим преиму-

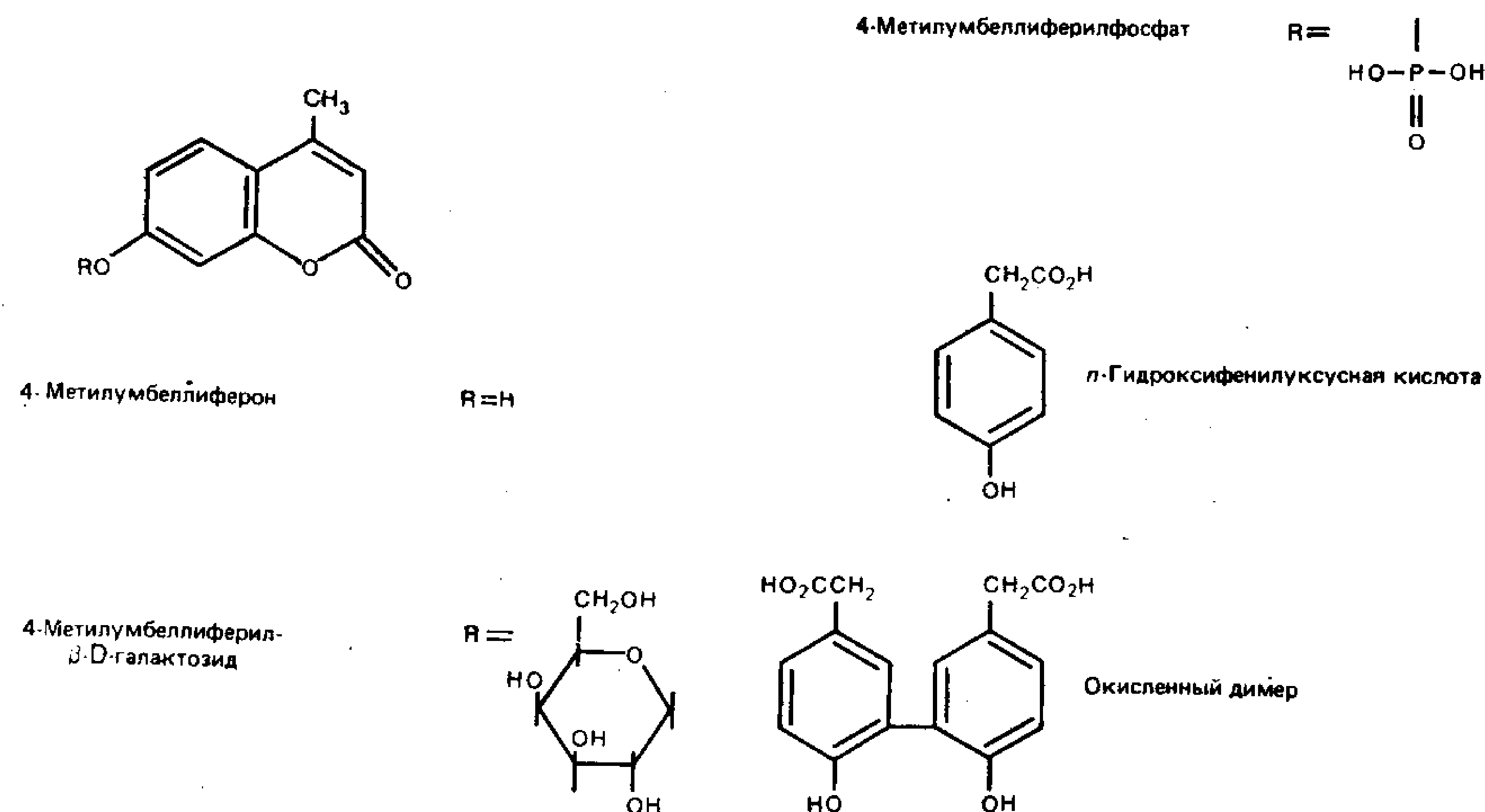


Рис. 19-1. Структуры субстратов и продуктов.

ществам по таким параметрам, как стоимость, чувствительность и стабильность. В качестве второго субстрата во всех случаях используется пероксид водорода.

Оборудование

Большинство исследователей, применяющих флуориметрические варианты ИФА, используют обычные флуориметры, при работе с которыми необходимо вручную менять образцы и для каждого в отдельности проводить измерения. Эту работу можно существенно облегчить, оснастив прибор проточной ячейкой и автосамплером или иным автоматическим устройством, подающим жидкость. В продаже имеется ряд приборов, таких, как Advance (Syva), Encore (Baker Instruments) и TDx (Abbot Labs), которые могут в автоматическом режиме готовить пробы, проводить измерения сигнала и расчеты при флуоресцентном иммуноанализе. Несомненно, добавив определенные наборы фильтров и разработав соответствующие программы, эти приборы можно будет использовать и для флуориметрического ИФА.

Поскольку флуоресцентное излучение распространяется во всех направлениях, конструктивные возможности при создании флуоресцентного детектора гораздо шире, чем в случае адсорбционного детектора. Так, для сканирования пластин в тонкослойной хроматографии используют флуориметры, работающие в режиме отражения (Butler, Poole, 1983). Аналогичный детектор можно использовать и для измерений флуоресценции непосред-

ственно в лунках платы для иммунологического микротитрования. Описана конструкция световой камеры для визуального детектирования флуоресценции в таких лунках (Forghani et al., 1980).

При лазерном возбуждении флуоресценцию можно регистрировать в субмикролитровых объемах пробы. Если при этом использовать микровариант собственно ИФА (Leabeck, Creme, 1980, 1981), то можно количественно определять антигены с использованием минимальных объемов проб и реагентов.

Применение

В табл. 19-2 приведен перечень примеров использования флуориметрического ИФА, иллюстрирующий разнообразие возможностей определения различных веществ и применение различных методических вариантов иммуноанализа. При описании этих примеров опущен целый ряд конкретных деталей эксперимента, однако приведены данные о предельной чувствительности, которая не ниже, а в некоторых случаях и выше чувствительности методов РИА. В этом разделе мы рассмотрим результаты специальных исследований, в которых сравнивали возможности применения колориметрических и флуориметрических вариантов ИФА.

Авторы одной из работ (Neurath, Strick, 1981) сообщают о том, что замена хромогенного субстрата на флуорогенный позволяет повысить чувствительность определения β-галактозидазы на три порядка. Теоретически это должно означать, что применение флуориметрии вместо колориметрии при проведении ИФА с использованием β-галактозидазы в качестве индикаторного фермента может в тысячу раз снизить предел обнаружения антигена. В действительности несмотря на то, что флуориметрический вариант ИФА, который авторы использовали для обнаружения поверхностного антигена вируса гепатита В человека, был примерно на два порядка более чувствительным, чем РИА, им не удалось достичь предельной чувствительности, предсказанной на основании данных по предельной чувствительности определения самого фермента. Оказалось, что чувствительность ограничивается фоновой флуоресценцией, наблюдаемой для образцов, не содержащих антигена. Фоновая флуоресценция может быть вызвана неспецифическим связыванием использованных антител. В таком случае повышения чувствительности можно достичь, только повышая специфичность собственно иммунохимических компонентов системы. Другое возможное объяснение связывает фоновую флуоресценцию с присутствием в реакционной смеси флуоресцирующих примесей. В этом случае следует использовать более чистые реагенты и(или) проводить окончательные измерения флуорес-

Таблица 19-2. Применение флуориметрических методов ИФА

Анализируемое вещество	Вариант ИФА[1])	Нижний предел обнаружения	Источник данных
А. Индикаторный фермент — β-галактозидаза			
Ферритин	Н—Ат—Аг—АтФ	0,25 мкг/л	Konijn et al., 1982; Watanabe et al., 1979
Ферритин	То же	0,03 фмоль	Ishikawa, Kato, 1978
Поверхностный антиген вируса гепатита В	»	5—10 пг	Neurath, Strick, 1981
Поверхностный антиген вируса гепатита В	»	0,03—0,05 фмоль	Ishikawa, Kato, 1978
IgG человека	»	5 фмоль	Kato et al., 1975
IgG человека	»	3 фмоль	Kato et al., 1976b
IgG человека	»	0,3 фмоль	Kato et al., 1976a
α-Фетопротеин	»	2 фмоль	Ishikawa, Kato 1978
Орнитин-δ-аминотрансфераза	»	0,03 фмоль	То же
Хориогонадотропин	Ат′—Ат—АгФ против Ат′—Ат—Аг	0,4 мМЕ/мл (в 10 раз чувствительнее РИА)	Kikutani et al., 1978
Гентамицин	Аг—АтФ	5 мкг/мл	Leaback, Creme, 1981
Инсулин	Ат′—Ат—АгФ против Ат′—Ат—Аг	20 пг	Kitagawa, Aikawa, 1976
Инсулин	Н—Ат—АгФ против Н—Ат—Аг	0,5 мкМЕ	Kato, Hamaguchi, 1975
Инсулин	Н—Ат—Аг—АтФ	0,02 фмоль	Ishikawa, Kato, 1978
Инсулин	То же	5 мМЕ/л	Kato et al., 1979
cAMP	Н—Ат′—Ат—АгФ против Н—Ат′—Ат—Аг	5 фмоль	Yamamoto, Tsuji, 1981
cGMP	То же	0,5 фмоль	Yamamoto et al., 1982
Кленобутерол	»	0,5 пг	Yamamoto, Iwata, 1982
Бефунолол и его метаболиты	»	10 пг/мл и 75 пг/мл	Sato, Yamamoto, 1983

Продолжение

Анализируемое вещество	Вариант ИФА[1])	Нижний предел обнаружения	Источник данных
Б. Индикаторный фермент — щелочная фосфатаза			
Ротавирус человека	Н—Ат—Аг—Ат—Ат′Ф	Разведение стандарта в 10^5 раз (по сравнению с 10^3 для колориметрического ИФА)	Yolken, Stopa, 1979
Полирибозофосфат	То же	10 пг/мл (по сравнению с 640 пг/мл для колориметрического ИФА)	Yolken, Leister, 1982
Антитела против ДНК	Н—Аг—Ат—Ат′Ф	В 16 раз ниже, чем для колориметрического ИФА	Ali, Ali, 1983
Антитела против цитомегаловируса	То же	Не сообщается	Forghani et al., 1980
В. Индикаторный фермент — пероксидаза хрена			
Тестостерон в плазме и слюне	Н—Ат—АгФ против Н—Ат—Аг	0,5 пг или <30 пМ	Türkes et al., 1979; Türkes et al., 1980
Эстрадиол	То же	50 пг	Numazawa et al., 1977
Тироксин	»	17 мкг/л	Arakawa et al., 1982
17α-гидроксипрогестерон	Н—Ат′—Ат—АгФ против Н—Ат′—Ат—Аг	1,0 пг	Arakawa et al., 1983
Неокарциностатин	То же	0,5 нг	Tsuji et al., 1978
Тиреотропный гормон	»	0,06 мкМЕ	Tsuji et al., 1978; Kato et al., 1979; Kato et al., 1980
Инсулин	»	2,5 мкМЕ/мл	Tsuji et al., 1978; Matsuoka et al., 1979
Инсулин	Н—Ат—Аг—АтФ	1,1 мкМЕ/мл или 7,9 пМ	Lidofsky et al., 1981; Hinsberg et al., 1981a Hinsberg et al., 1981b

[1]) Методика ИФА условно обозначена символами используемых реагентов: Ат — антитело, Ат′ — второе антитело, Аг — антиген, Ф — индикаторный фермент; Н — носитель. Символ тестируемого компонента подчеркнут.

ценции после хроматографического выделения продукта ферментативного превращения из реакционной смеси (Hinsberg et al., 1981). Автоматизированная высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с использованием флуориметрического детектирования является столь же быстрой и простой операцией, как и сцинтилляционный счет радиоактивности.

Хотя в целом ряде работ сообщается об успешном применении в качестве индикаторного фермента (см. табл. 19-2) β-галактозидазы, имеются сведения об артефактах, вызываемых содержащимися в анализируемой сыворотке примесями, которые были обнаружены при использовании этого фермента в ИФА инсулина (Kato et al., 1979). Авторам удалось избавиться от артефактных явлений, применив твердофазный сэндвич-метод и введя в состав используемых буферных растворов желатину. Та же проблема возникла и в работе Лидофски (Lidofsky, 1980), однако в этом случае меры, предложенные в работе Като и др. (Kato et al., 1979), оказались недостаточными. Других сообщений об аналогичных проблемах, связанных с использованием β-галактозидазы в качестве индикаторного фермента, не поступало. В качестве метки при флуориметрическом ИФА инсулина в образцах сыворотки успешно применяют пероксидазу хрена (Lidofsky et al., 1981; Hinsberg et al., 1981b; Hinsberg et al., 1981a; Matsuoka et al., 1979).

Известны две работы, в которых прямо сравнивают колориметрический и флуориметрический варианты ИФА с использованием одних и тех же методик и реагентов, за исключением субстратов и систем детектирования. В одной из них (Yolken, Stopa, 1979) показано, что при тестировании ротовируса человека в образцах кала флуориметрический метод оказывается в 100 раз более чувствительным, чем РИА или колориметрический ИФА. Во второй работе (Ali, Ali, 1983) сообщается о 16-кратном повышении чувствительности при переходе от колориметрического к флуориметрическому методу ИФА антител против ДНК, являющихся маркером системной красной волчанки. В обоих случаях выявленные преимущества применения флуориметрии позволили значительно повысить эффективность клинического тестирования.

Интересное сравнительное исследование флуорогенных и хромогенных субстратов для ИФА было проведено в работе Иолкена и Лейстера (Yolken, Leister, 1982). В роли тестируемого объекта авторы использовали полирибозофосфат из *Haemophilus influenzae*. Для анализа использовали вариант твердофазного сэндвич-ИФА с применением щелочной фосфатазы в качестве индикаторного фермента. В условиях 10-минутной инкубации с субстратом было найдено, что флуориметрический метод в 64 раза чувствительней колориметрического. Однако с увеличением времени инкубации наблюдалось возрастание чувствительности колориметрического метода, тогда как чувствительность флуориметрического метода не менялась. При использовании 240-минутной инкубации предельная чувствительность в обоих методах оказывалась одинаковой. По мнению авторов, это связано с ограничениями в чувствительности, обусловленными собственно иммунохимическими процессами, которые невозможно преодолеть, модифицируя лишь систему обнаружения продукта ферментативной реакции. Но даже и в этом случае использование флуориметрии позволяет получить весьма существенный выигрыш во времени.

Иммуноферментный анализ с применением лазерной флуориметрии

Приведенные выше примеры иллюстрируют, какие возможности дает повышение чувствительности обнаружения продукта индикаторной ферментативной реакции в ИФА. Для более полного использования этих возможностей можно сочетать преимущества флуориметрических методов детектирования с лазерным возбуждением флуоресценции. Использование лазера в качестве источника возбуждения флуоресценции при ИФА дает три важных преимущества. Во-первых, высокая интенсивность лазерного облучения позволяет непосредственно наблюдать более интенсивную флуоресценцию. Усиление флуоресцентного сигнала наблюдается как для тестируемого объекта, так и для фона, поэтому необходимо принимать специальные меры (см. ниже) для поддержания фонового сигнала на относительно невысоком уровне. Во-вторых, лазерное излучение является монохроматическим, поэтому возможное наложение рэлеевских и рамановских зон невелико и может быть отсечено с помощью определенных фильтров. И в-третьих, лазерный пучок легко сфокусировать на образце с минимальным объемом. Проточная ячейка для лазерного флуориметрического ИФА типа той, что показана на рис. 19-2, может быть очень маленькой и простой по конструкции.

Вышеупомянутые преимущества лазерной флуориметрии по сравнению с обычной флуориметрией или колориметрией для обнаружения продукта превращения субстрата были продемонстрированы в работе Imasaka, Zare, 1979. Лидофски и др. (Lidofsky et al., 1979) использовали в иммунофлуоресцентном анализе лазерное возбуждение, а сочетание лазерной флуориметрии с иммуноферментным анализом

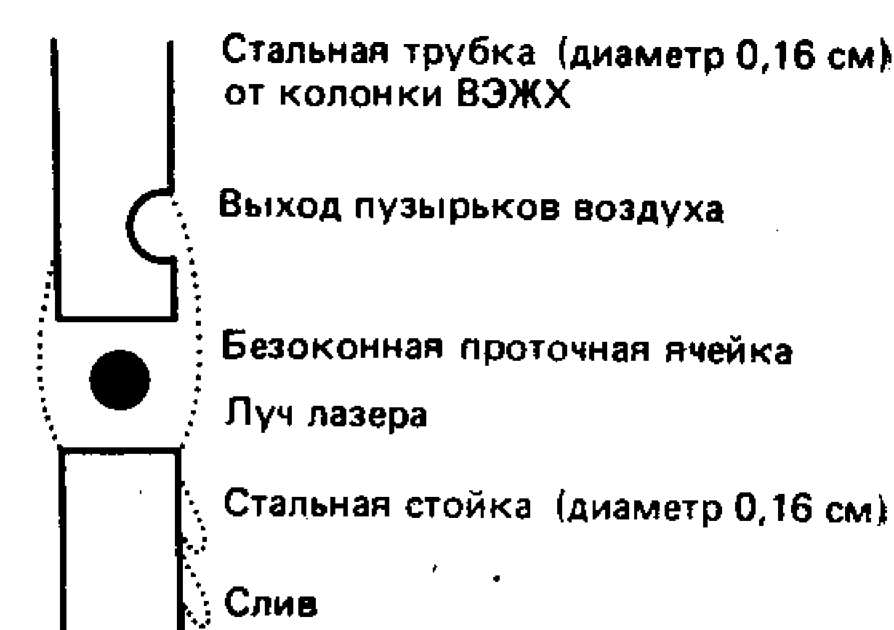


Рис. 19-2. Схема проточно-капельного лазерного флуоресцентного детектора.

(ЛФ-ИФА) было опробовано в ряде работ на инсулине в качестве модельного антигена (Lidofsky et al., Hinsberg et al., 1981b; Hinsberg et al., 1981a). Рассмотрим подробнее полученные в этих работах результаты.

Во избежание роста фоновой флуоресценции был принят целый ряд предосторожностей. Использовали вариант твердофазного сэндвич-ИФА, поскольку он позволяет в значительной степени отмыть флуоресцирующие компоненты анализируемой сыворотки до стадии инкубации с субстратом. На всех этапах использовали бидистиллированную воду. Субстрат — *п*-оксифенилуксусную кислоту — перед использованием очищали препаративной хроматографией в обращенных фазах. И наконец, непосредственно перед лазерно-флуориметрическим детектированием продукт ферментативной реакции очищали с помощью ВЭЖХ. Поскольку фоновая флуоресценция на конечном этапе не является лимитирующим фактором, стадию ВЭЖХ можно заменить на проточно-инжекционный анализ или на обычные измерения в кювете. В то же время в оптимальных условиях при снятии всех ограничений, кроме фоновой флуоресценции, с помощью ВЭЖХ, легко поддающейся автоматизации, можно значительно повысить чувствительность анализа.

Для ИФА использовали набор реактивов «Insulotec Mochida EIA kit» фирмы Mochida Pharmaceutical Co. (Токио, Япония). В этот набор входят антитела, иммобилизованные на носителе, и антитела, меченные пероксидазой. Вместо хромогенного субстрата 5-аминосалициловой кислоты использовали флуорогенный субстрат *п*-гидроксифенилуксусную кислоту. Анализ проводили по предлагаемой фирмой методике, несколько уменьшив времена трех инкубаций и приняв простые меры для предотвращения неспецифического связывания (Hinsberg et al., 1981b).

Необходимая для анализа аппаратура схематически представлена на рис. 19-3. По завершении инкубации аликвоту реакционной смеси наносят на обратнофазовую колонку для ВЭЖХ. Наибольший сигнал флуоресценции получают в том случае, если перед поступлением в проточно-капельный детектор элюат с колонки защелачивают (см. рис. 19-2). Для возбуждения флуоресценции используют гелий-кадмиевый ионный лазер, непрерывно работающий на постоянной длине волны 325 нм. Флуоресценцию в элюате регистрируют с помощью фотоумножителя после прохождения через жидкостные фильтры, выделяющие спектральную область 410—490 нм. Сигнал с фотоумножителя поступает непосредственно на самописец. Хроматографическое разделение каждого препарата занимает 4 мин. Величина флуоресцентного сигнала оценивается по высоте соответствующего пика. С помощью этой системы детектирования удается обнаруживать до 10^{-17} моль пероксидазы (Lidofsky, 1980), что на два порядка ниже предела, достигнутого в предшествующих работах (Guilbault et al., 1968).

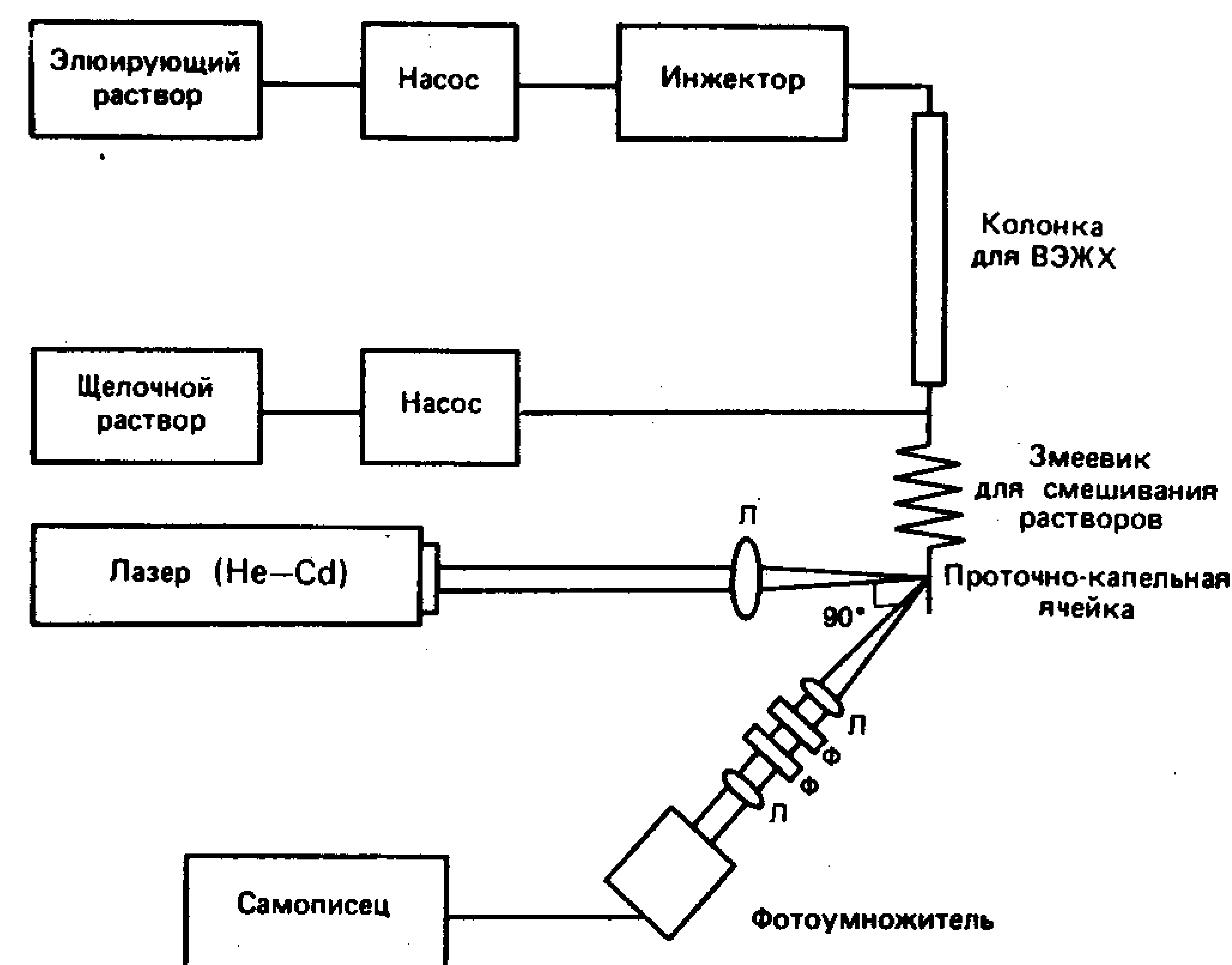


Рис. 19-3. Схема проведения ВЭЖХ в сочетании с лазерным флуориметрическим детектированием. Л — линзы, Ф — фильтры.

В случае инсулина с помощью ЛФ-ИФА за 45 мин удается проводить полный анализ (включая все стадии инкубации), достигая чувствительности определения 1,1 мкМЕ/мл (7,9 пМ). При использовании стандартного колориметрического варианта анализ занимает не менее 3 ч и позволяет определять 5 мкМЕ/мл инсулина. В случае ЛФ-ИФА чувствительность лимитируется неспецифическим связыванием антител в образцах, не содержащих инсулина. При регистрации продукта ферментативной реакции отношение сигнала к фону выше 100, и поэтому повышение специфичности иммунохимических процессов может непосредственно привести к повышению чувствительности, уменьшению объема образца и (или) дальнейшему сокращению времени инкубации.

Заключение

Использование флуориметрии в сочетании с иммуноферментным анализом представляет собой простую модификацию существующих методов. Нет сомнений, что этот метод получит более широкое распространение, если в продажу будут поступать соответствующие приборы. Повышение эффективности регистрации продукта ферментативной реакции само по себе не компенсирует все прочие лимитирующие факторы ИФА, такие,

как недостаточно высокая авидность или неспецифическое связывание. Однако, как показано в этом обзоре, замена колориметрического детектирования на флуориметрическое часто позволяет достичь повышения чувствительности и сокращения времени и расхода реагентов.

Литература

Ali A., Ali R. (1983). Enzyme linked Immunosopbent Assay for Anti-DNA Antibodies, J. Immunol. Meth., **56**, 341—346.

Arakawa H., Maeda M., Tsuji A., Ishii S., Naruse H., Kleinhammer G. (1982). Fluorophotometric Enzyme Immunoassay of Thyroxine in Dried Blood Samples on Filter Paper, Bunseki Kagaku, **31**, E55—E61.

Arakawa H., Maeda M., Tsuji A., Naruse H., Suzuki E., Kambegawa A. (1983). Fluorescence Enzyme Immunoassay of 17α-hydroxyprogesterone in Dried Blood Samples on Filter Paper and Its Application to Mass Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia, Chem. Pharm. Bull., **31**, 2724—2731.

Bradley A. B., Zare R. N. (1976). Laser Fluorimetry. Sub-part-per-trillion Detection of Solutes, J. Am. Chem. Soc., **98**, 620—621.

Butler H. T., Poole C. F. (1983). Optimization of a Scaning Densitometer for Fluorescence Detection in High Performance Thin-layer Chromatigraphy, J. High Res. Chrom. Comm., **6**, 77—81.

Forghani B., Dennis J., Schmidt N. J. (1980). Visual Reading of Enzyme Immunofluorescence Assays for Human Cytomegalovirus Antibodies, J. Clin. Microbiology, **12**, 704—708.

Guilbault G. G. (1968). Use of Enzymes in Analytical Chemistry, Anal. Chem., **40**, 459R—471R.

Guilbault G. G., Brignac P. J., Juneau M. (1968). New Substrates for the Fluorometric Determination of Oxidative Enzymes, Anal. Chem., **40**, 1256—1263.

Guilbault G. G., Brignac P., Zimmer M. (1968). Homovanillic Acid as a Fluorometric Substrate for Oxidative Enzymes, Anal. Chem., **40**, 190—196.

Hinsberg W. D., Milby K. H., Lidofski S. D., Zare R. N. (1981a). Application of Laser Fluorimetry to Enzyme-linked Immunoassay, Soc. Photo-optical Instrumentation Engineers, **286**, 132—138.

Hinsberg W. D., Milby K. H., Zare R. N. (1981b). Determination of Insulin in Serum By Enzyme Immunoassay, Anal. Chem., **53**, 1509—1512.

Imasaka T., Zare R. N. (1979). Enzyme Amplification Laser Fluorimetry, Anal. Chem., **51**, 2082—2085.

Ishikawa E., Kato K. (1978). Ultrasensitive Enzyme Immunoassay, Scand. J. Immunol., 8 Suppl., **7**, 43—55.

Kato K., Fukui H., Hamaguchi Y., Ishikawa E. (1976a). Enzyme-linked Immunoassay: Conjugation of the FAB′ Fragment of Rabbit IgG with β-D-galactosidase from *E. coli*, J. Immunology, **116**, 1554—1160.

Kato K., Hamaguchi Y., Fukui H., Ishikawa E. (1976b). Enzyme-linked Immunoassay: Conjugation of Rabbit Anti-(Human Immunoglobulin G) Antibody with β-D-galactosidase from *Escherichia coli* and Its Use for Human Immunoglobulin G Assay, Eur. J. Biochem., **62**, 285—292.

Kato K., Hamaguchi Y., Fukui H., Ishikawa E. (1975a). Enzyme-linked Immunoassay: Novel Method for Synthesis of the Insulin-β-D-galactosidase Conjugate and its Applicability for Insulin Assay, J. Biochem., **78**, 235—237.

Kato K., Hamaguchi Y., Fukui H., Ishikawa E. (1975b). Enzyme-linked Immunoassay: A Simple Method for Synthesis of the Rabbit Antibody-β-D-galactosidase Complex and Its General Applicatibility, J. Biochem., **78**, 423—425.

Kato N., Ishii S., Naruse H., Irie M., Tsuji A. (1980). Fluorophotometric Enzyme Immunoassay of Thyroid-Stimulating Hormone Using Peroxidase as Label, J. Pharmacobio-Dyn., **3**, S-28.

Kato N., Naruse H., Irie M., Tsuji A. (1979). Fluorophotometric Enzyme Immunoassay of Thyroid-Stimulating Hormone, Analyt. Biochem., **96**, 419—425.

Kato K., Umeda Y., Suzuki F., Hayashi D., Kosaka A. (1979). Evaluation of a Solid-Phase Enzyme Immunoassay for Insulin, Clin. Chem., **25**, 1306—1308.

Kikutani M., Ishiguro M., Kitagawa T., Imamura S., Miura S. (1978). Enzyme Immunoassay of Human Chorionic Gonadotropin Employing β-galactosidase as Label, J. Clin. Endocrinol. and Metab., **47**, 980—984.

Kitagawa T., Aikawa T. (1976). Enzyme Coupled Immunoassay of Insulin Using a Novel Coupling Reagent, J. Biochem., **79**, 233—236.

Konijn A. M., Levy R., Link G., Hershko C. (1982). A Rapid and Sensitive ELISA for Serum Ferritin Employing a Fluorogenic Substrate, J. Immunological Methods, **54**, 297—307.

Leaback D. H., Creme S. (1980). A New Experimental Approach to Fluorometric Enzyme Assays Employing Disposable Micro-Reaction Chambers, Analyt. Biochem., **106**, 314—321.

Leaback D. H., Creme S. (1981). Extremely Economical Micro-ERMA Procedures for Performing 'Sequential' Fluorogenic Enzyme Assays and Fluorogenic Enzyme Immunoassays on Human Serum, Biochem. Soc. Trans., **9**, 580.

Lidofsky S. D., 1980. Laser Fluorescence Immunoassay, Ph. D. Dissertation, Columbia University.

Lidofsky S. D., Hinsberg W. D., Zare R. N. (1981). Enzyme-linked Sandwich Immunoassay for Insulin Using Laser Fluorimetric Detection, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1901—1905.

Lidofsky S. D., Imasaka T., Zare R. N. (1979). Laser Fluorescence Immunoassay of Insulin, Anal. Chem., **51**, 67—69.

Matsuoka K., Maeda M., Tsuji A. (1979). Fluorescence Enzyme Immunoassay for Insulin, Chem. Pharm. Bull., **27**, 2345—2350.

Neurath A. R., Strick N. (1981). Enzyme-linked Fluorescence Immunoassays Using β-galactosidase and Antibodies Covalently Bound to Polystyrene Plates, J. Virological Methods, **3**, 155—165.

Numazawa M., Haryu A., Kurosaka K., Nambara T. (1977). Picogram Order Enzyme Immunoassay of Oestradiol, FEBS Letts., **79**, 396—398.

Rotman B. (1961). Measurement of Activity of Single Molecules of β-D-galactosidase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **47**, 1981—1991.

Sato S., Yamamoto I. (1983). Enzyme Immunoassays for β-adrenoreceptor Blocking Agent, Befunolol and Its Main Metabolite, M1, J. Immunoassay, **4**, 351.

Tsuji A., Maeda M., Arakawa H., Matsuoka K., Kato N., Naruse N., Irie M., 1978. Enzyme Immunoassay of Hormones and Drugs by Using Fluorescence and Chemiluminescence Reaction, Enzyme Labelled Immunoassay of Hormones and Drugs (Pal S. B., ed.), Walter de Gruyter, Berlin and New York, 327.

Türkes A. O., Türkes A., Joyce B. G., Riad-Fahmy D. (1980). A Sensitive Enzyme Immunoassay with a Fluorimetric End-Point for the Determination of Testosterone in Female Plasma and Saliva, Steroids, **35**, 89—101.

Türkes A. O., Türkes A., Read G. F., Fahmy D. R. (1979). A Sensitive Fluorometric Enzyme Immunoassay for Testosterone, J. Endocrinol., **83**, 31P.

Watanabe N., Niitsu Y., Ohtsuka S., Koseki J., Kohgo Y., Urushizaki I., Kato K., Ishikawa E. (1979). Enzyme Immunoassay for Human Ferritin, Clin. Chem., **25**, 80—82.

Yamamoto I., Iwata K. (1982). Enzyme Immunoassay for Clenbuterol, an β_2-Adrenergic Stimulant, J. Immunoassay, **3**, 155—171.

Yamamoto I., Takai T., Tsuji J. (1982). Enzyme Immunoassay for Cytidine 3′,5′-Cyclic Monophosphate (Cyclic CMP), Immunopharmacology, **4**, 331.

Yamamoto I., Tsuji J. (1981). Enzyme Immunoassay of Cyclic Adenosine 3′,5′-Monophosphate (AMP) Using β-D-galactosidase as Label, Immunopharmacology, **3**, 53—59.

Yolken R. H., Leister F. J. (1982). Comparison of Fluorescent and Colorigenic Substrates for Enzyme Immunoassays, J. Clin. Microbiology, **15**, 757—760.

Yolken R. H., Stopa P. J. (1979). Enzyme-linked Fluorescence Assay: Ultrasensitive Solid-Phase Assay for Detection of Human Rotovirus, J. Clin. Microbiology, **10**, 317—321.

Глава 20

Радиально-распределительный иммуноферментный анализ

Джозеф Л. Джигель

Введение

Радиально-распределительный иммуноанализ позволяет с высокой чувствительностью определять как низкомолекулярные, так и высокомолекулярные лиганды. Весь анализ полностью проводится на небольшом кусочке фильтровальной бумаги и может быть завершен менее чем за 10 мин. Система регистрации может быть основана на применении меток любых типов, например ферментов, флуорофоров, хромофоров или радиоактивных изотопов. Используя ферментные метки и флуорогенные субстраты, нам удается достичь очень высокого уровня чувствительности. Общие принципы построения систем радиально-распределительного ИФА проиллюстрированы на рис. 20-1.

Антитела к тестируемому компоненту вначале иммобилизуют на поверхности фильтровальной бумаги. Фильтры с антителами вставляют в пластиковые рамки и помещают в соответствующие ячейки для последующего их автоматического перемещения. После высушивания эти фильтры достаточно стабильны. Как показано на рис. 20-1, их можно использовать для проведения трех вариантов анализа. При *последовательном анализе* образцы, содержащие искомый антиген, наносят на сухие фильтры на 2 мин. Затем добавляют избыток конъюгата тестируемого антигена с ферментом для насыщения всех непрореагировавших центров связывания, оставшихся на поверхности фильтра. Спустя 3 мин в центр фильтра наносят раствор субстрата таким образом, чтобы избыток не связавшегося с антителами конъюгата вымывался по принципу радиальной хроматографии. Последний этап является ключевым для данного метода ИФА и общим для всех трех вариантов анализа.

Для определения активности индикаторного фермента измеряют поверхностную флуоресценцию в центральной части фильтра, содержащей комплексы [антиген—антитело]. Затем на основании полученных значений активности по соответствующей калибровочной кривой рассчитывают концентрацию тестируемого вещества.

Последовательный вариант анализа весьма удобен для непосредственного определения антигенов, таких, как дигоксин, содержащихся в сыворотке в низких концентрациях.

Второй вариант анализа проводят в *конкурентном режиме*. В этом случае образец, содержащий тестируемый антиген

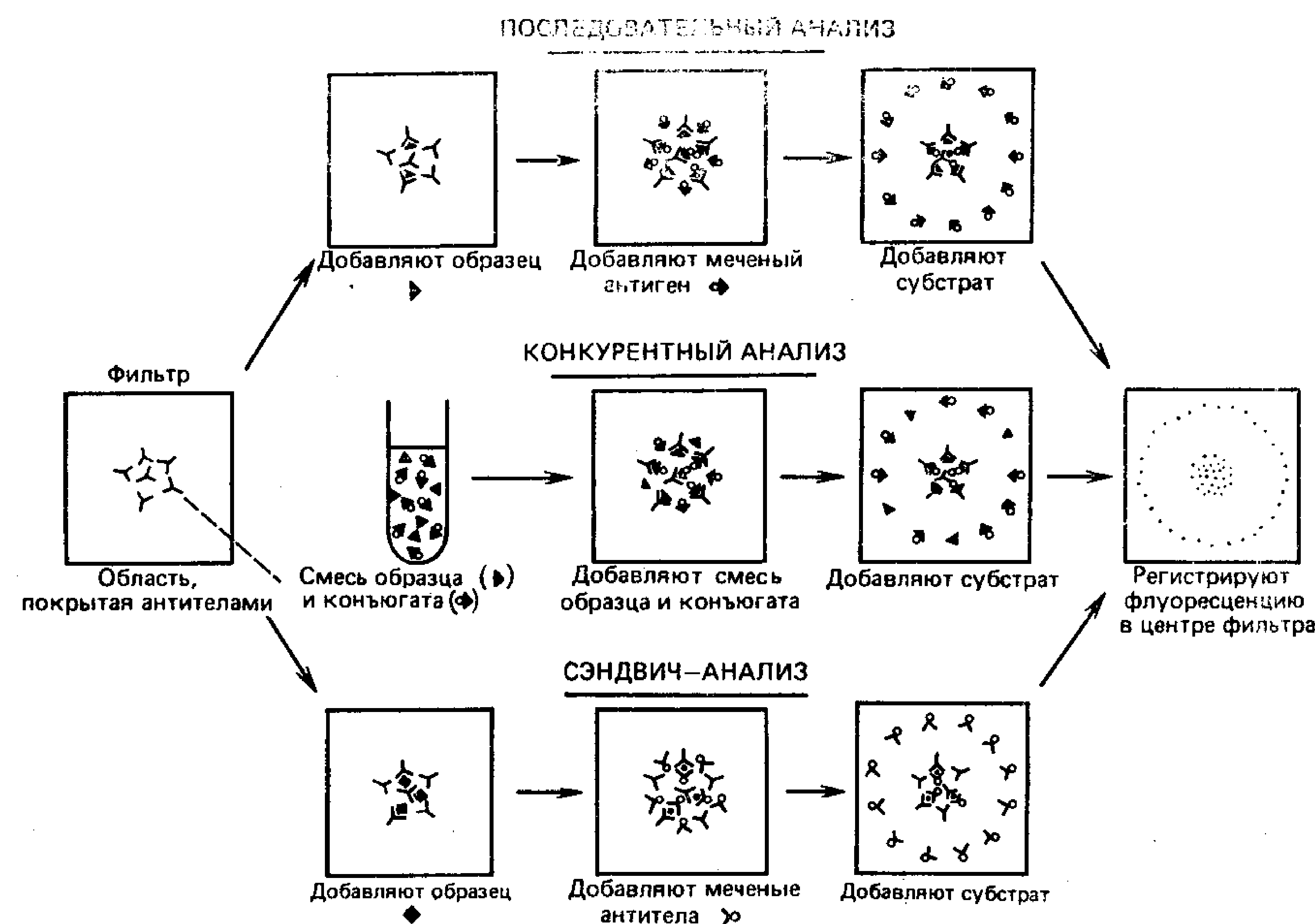


Рис. 20-1. Схема проведения радиально-распределительного иммуноферментного анализа. Центральную область фильтра покрывают антителами и высушивают. Показаны три возможных варианта проведения анализа.

Последовательный анализ. Образец наносят на фильтр и затем добавляют избыток конъюгата [антиген—фермент].

Конкурентный анализ. Образец предварительно смешивают с конъюгатом [антиген—фермент]. Аликвоту такой смеси наносят на фильтр, покрытый антителами.

Сэндвич-анализ. Образец наносят на фильтр и затем добавляют аликвоту раствора конъюгата [антитело—фермент].

В каждом из вариантов вслед за перечисленными этапами в центр фильтра наносят раствор субстрата таким образом, чтобы избыток конъюгата вымывался к краям фильтра. Активность связавшегося фермента регистрируют по скорости изменения флуоресценции в центральной части фильтра.

и конъюгат [антиген—индикаторный фермент] смешивают перед нанесением на фильтр. Субстрат добавляют так же, как и при последовательном анализе, и оценивают активность фермента по развитию окраски в центре фильтра. Конкурентный вариант анализа удобен для определения высоких концентраций тестируемых компонентов, с которыми приходится сталкиваться, например при анализе терапевтических лекарственных препаратов. Кроме того, конкурентный режим анализа можно использовать при определении тироксина, для чего предварительно необходимо вытеснить его из комплекса с соответствующими тироксинсвязывающими белками.

Третий вариант представляет собой *иммунометрический* метод, или *сэндвич*-анализ, для которого используют антитела, содержащие ферментную метку. По способу проведения этот вариант анализа напоминает последовательный анализ. Сэндвич-анализ удобен для определения крупных антигенов, таких, как ферритин, тиреотропин или вирус гепатита. Поскольку отношение площади поверхности к объему для стекловолокнистой фильтровальной бумаги весьма велико, на фильтре может быть адсорбировано довольно большое количество антител. Благодаря этому анализ на фильтре может проходить с достаточно высокой скоростью.

Описана автоматизированная система радиально-распределительного ИФА (Giegel, 1982). С помощью разработанной аппаратуры достигается автоматическое нанесение всех препаратов, промывка раствором субстрата и регистрация флуоресценции поверхности каждого из фильтров.

В данной главе на конкретных примерах рассмотрены особенности проведения каждого из трех вышеназванных вариантов анализа. В качестве примеров разбираются методики определения дигоксина в сыворотке (последовательный анализ), тироксина в сыворотке (конкурентный анализ) и ферритина в сыворотке (сэндвич-анализ). Анализ одного обраца в каждом из этих вариантов занимает менее 10 мин.

Материалы и методы

Оборудование

Все этапы анализа, показанные на рис. 20-1, осуществляются автоматически на приборе, производимом отделением «American Dade» Корпорации снабжения больниц (American Hospital Supply Corporation). Сам прибор изображен на рис. 20-2. Необходимое количество фильтров, покрытых антителами, помещают в соответствующий блок загрузки фильтров, а образцы — в ячейки коллектора для проб. Если, как в случае конкурентного анализа, необходимо использовать различные разведения образца и конъюгата, их готовят предварительно и переносят вручную в рабочие ячейки. Раствор ферментного конъюгата помещают в резервуар, соединенный с насосом, предназначенным для подачи конъюгата, а раствор субстрата — в резервуар, соединенный с насосом, предназначенным для подачи субстрата. На панели управления набирают номер, соответствующий данному варианту анализа, а встроенный микропроцессор автоматически задает параметры проведения анализа.

Первый этап анализа заключается в нанесении образца (при необходимости соответствующим образом разведенного)

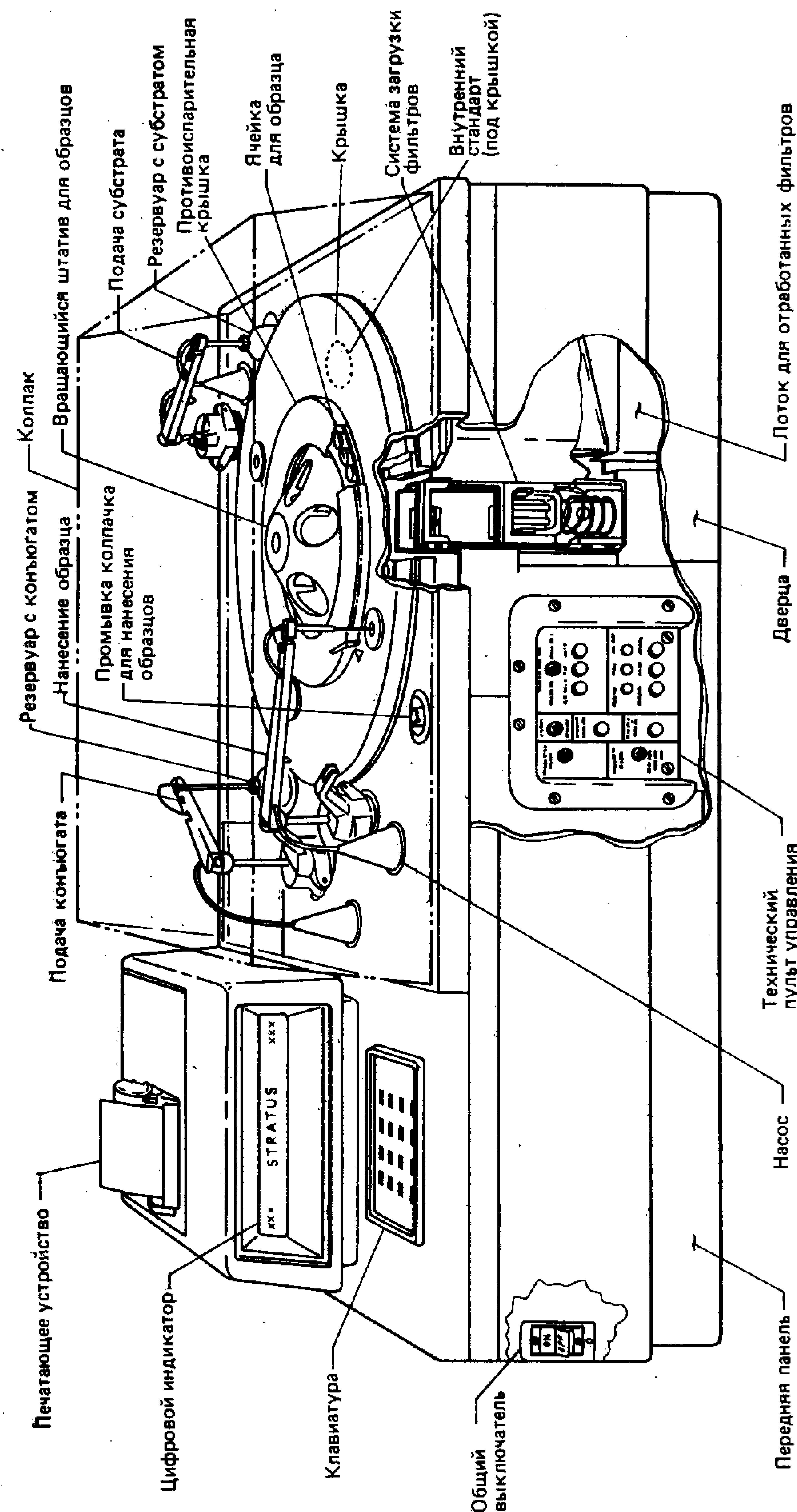


Рис. 20-2. Устройство прибора Stratus.

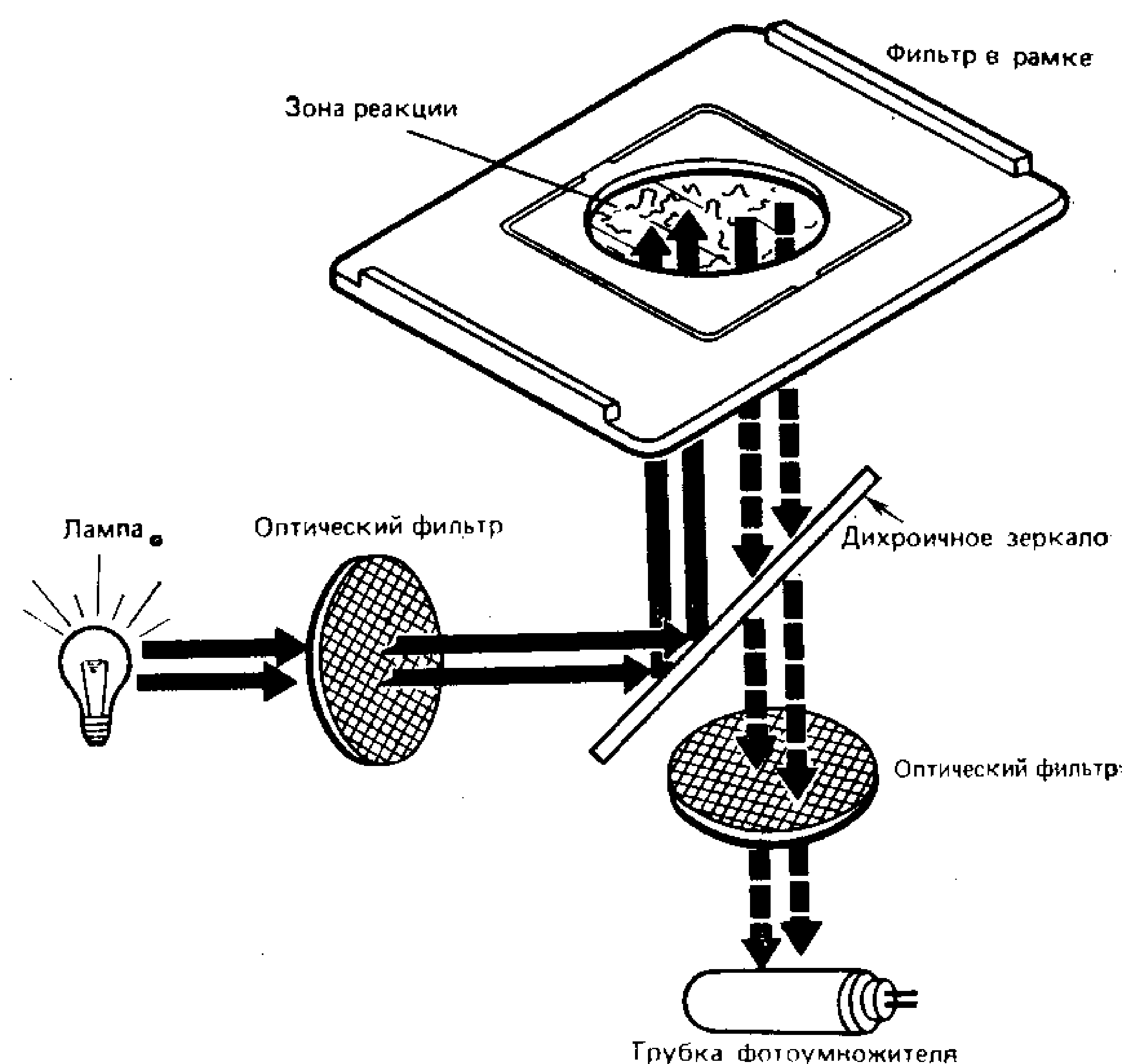


Рис. 20-3. Устройство системы для фронтально-поверхностной флуориметрии.

на фильтр, расположенный под специальным отверстием для нанесения образца. Перемещение обычно осуществляется со скоростью один шаг (один фильтр) в минуту. До блока регистрации фильтр доходит за 8 шагов, т. е. полное время анализа одного образца составляет около 8 мин. После нанесения образца фильтр перемещается к отверстию для нанесения конъюгата, обработка которым осуществляется при последовательном или сэндвич-анализе. Далее фильтр перемещается к месту нанесения раствора субстрата. Этот этап является основным при радиально-распределительном ИФА. В ходе нанесения раствора в центр фильтра молекулы всех компонентов, которые не связались с антителами, вымываются по направлению к краям фильтра. В то же самое время происходит ферментативное расщепление субстрата, сопровождающееся образованием флуоресцирующего продукта. Активность фермента определяется с помощью прямой поверхностной флуориметрии при попадании фильтра в блок регистрации.

Схема блока регистрации показана на рис. 20-3. Непрерывное считывание сигнала проводят с небольшой зоны в центральной части фильтра и рассчитывают скорость изменения флуоресценции приблизительно за 30-секундный интервал регистрации. Поскольку весь свободный антиген оказывается вне зоны оптической регистрации, его вклад в общую ферментативную активность не детектируется. Апертура регистрирующего устройства имеет обычно меньший диаметр, чем площадь, по-

крытая антителами, поэтому с каждого фильтра считывается только часть связанного антигена. Ферментативная активность на каждом фильтре пропорциональна концентрации тестируемого компонента. Соответствующая калибровочная кривая для каждого теста строится с использованием серии из шести разведений калибровочного стандарта. Результаты анализа рассчитывают по этой кривой с использованием модифицированного четырехпараметрового логистического метода (Rodbard, 1978).

Получение реагентов

Приготовление фильтров, покрытых антителами

Кроличьи антитела к дигоксину приобретали у Antibodies, Inc., а кроличьи антитела к тироксину — у Cambridge Medical Diagnostics, Inc. Антитела к ферритину получали иммунизацией новозеландских кроликов ферритином из печени человека.

Ферритин выделяли по модифицированной методике Граника (Granick, 1942) и подвергали дополнительной очистке на сефарозе 6B. Каждому кролику вводили по 100 мкг очищенного ферритина, смешанного с равным объемом адъюванта Фрейнда. Через 11 нед проводили повторную иммунизацию такой же дозой антигена. Спустя еще 8 нед от 5 кроликов брали кровь, из которой получали антисыворотку, используемую для покрытия фильтров антителами. Антитела козы против иммуноглобулинов кролика приобретали у Antibodies, Inc. Стекловолокнистую фильтровальную бумагу типа GF/F (Whatman) резали на квадратики со стороной 2,5 см. Для проведения анализа эти квадратики помещали в специальные пластиковые рамки. В некоторых случаях для покрытия фильтров можно использовать просто первичные антитела, однако мы обнаружили, что связывание антител с поверхностью фильтра оказывается значительно более эффективным при использовании предварительно полученного растворимо-

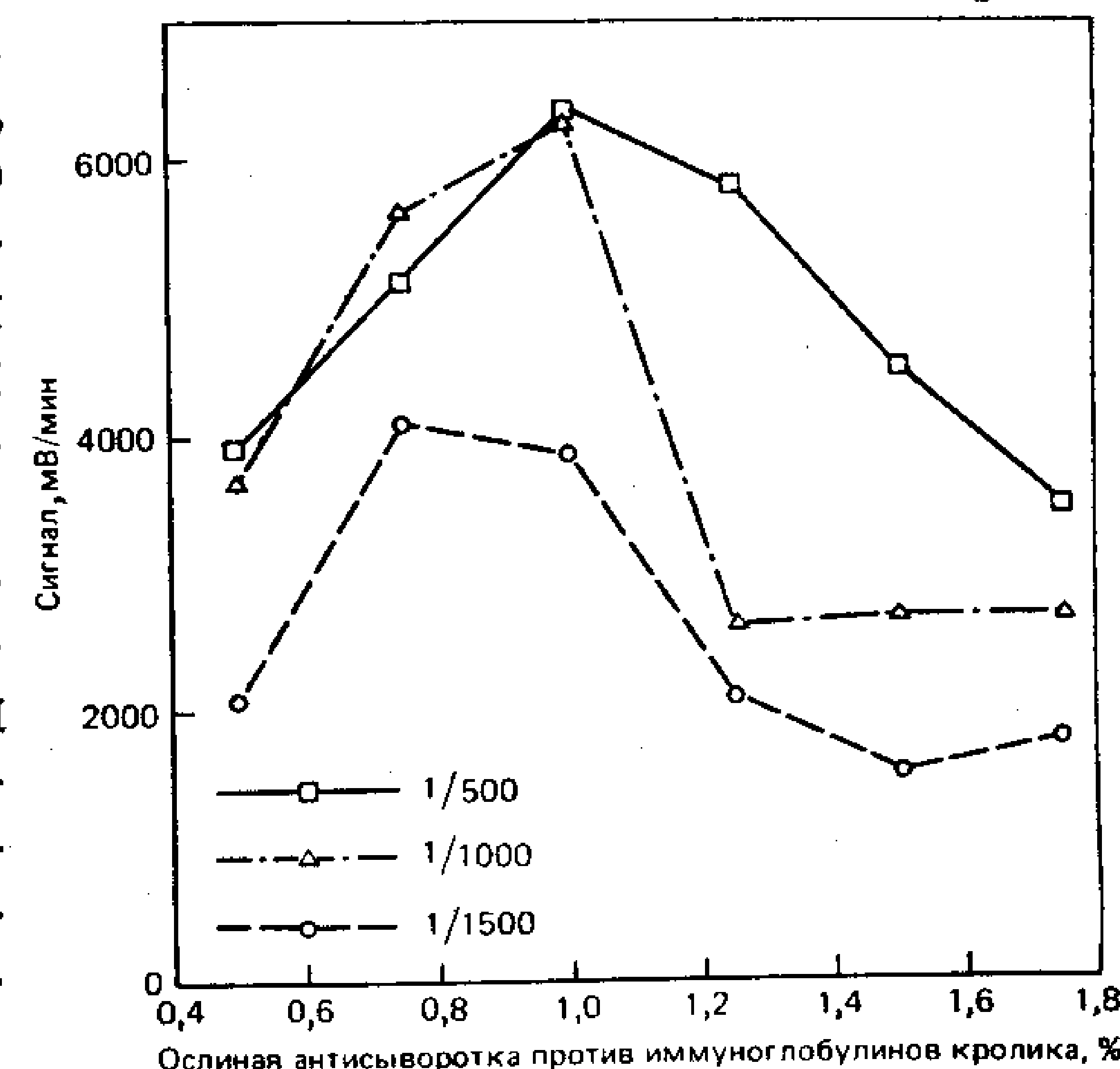


Рис. 20-4. Оптимизация процесса покрытия фильтров антителами против ферритина. (Цифры на оси абсцисс относятся к козьей антисыворотке. На рисунке указано ошибочное обозначение)

го комплекса [первичные антитела — вторые антитела]. Пример подбора оптимальной концентрации антител для покрытия фильтров и последующего определения ферритина показан на рис. 20-4. Растворы с тремя различными концентрациями первичных кроличьих антител к ферритину смешивали с различными разведениями препарата козьей антисыворотки, специфичной к иммуноглобулинам кролика, в указанных соотношениях. Образование иммунокомплекса протекало в течение ~24 ч. После отделения нерастворимых компонентов смеси фильтрованием через мембранный фильтрат, содержащий растворимый комплекс, наносили на фильтры и высушивали. Готовые фильтры хранили в сухом виде при 2—8 °C. В этих условиях они были устойчивы по крайей мере в течение года. Аналогичный процесс оптимизации осуществляли с антителами к дигоксину и тироксину.

Получение ферментных конъюгатов

Дигоксин сшивали с щелочной фосфатазой *E. coli* с помощью модифицированной методики Смита (Smith, 1970), основанной на периодатном окислении дигоксина и присоединении его к молекулам фермента через шиффовы основания. Полученный конъюгат очищали гель-фильтрацией. Тироксин присоединяли также к щелочной фосфатазе *E. coli*, проводя сначала восстановление SH-групп в молекуле фермента, а затем присоединение к ним аминопроизводного тироксина с использованием гетеробифункционального сшивающего агента.

Для анализа ферритина проводили конъюгацию β-галактозидазы с очищенными аффинной хроматографией Fab′-фрагментами кроличьих антител к ферритину (Ishikawa, 1983). Для этого хроматографией на QAE-сефадексе из кроличьей антиферритиновой антисыворотки выделяли фракцию IgG, которую обрабатывали пепсином для получения Fab′-фрагментов. Препарат, содержащий Fab′-фрагменты, очищали гель-фильтрацией на ультрогеле АсА 44, а затем — аффинной хроматографией на агарозе, содержащей иммобилизованный ферритин из селезенки человека. Полученную фракцию обрабатывали 2-меркаптоэтиламином, восстанавливая тем самым $F(ab')_2$-фрагменты до Fab′-мономеров. Активированное производное получали введением малеимидных групп при обработке N,N′-*o*-фенилендималеимидом, выделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-25 и сшивали с β-галактозидазой. Полученный конъюгат [Fab′— фермент] очищали, хроматографией на сефарозе 6В и разводили в 30 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,5, содержащем 150 мМ NaCl, 1% БСА, 1% нормальной кроличьей сыворотки и 0,1% азида натрия в качестве консерванта. Было установлено, что полученный таким образом конъюгат сохраняет стабильность при хранении в течение года при 2—8 °C.

Приготовление раствора для отмывки, содержащего субстрат

Для определения конъюгатов на основе щелочной фосфатазы в состав субстратсодержащего раствора для отмывки входит 370 мМ 4-метилумбеллиферилфосфат, 1 мМ $MgCl_2$ и 0,1 М трис, pH 9,0. При использовании в качестве индикаторного фермента β-галактозидазы аналогичный раствор представляет собой 300 мМ 4-метилумбеллиферил-β-D-галактопиранозид, полученный растворением 200 мг субстрата в 40 мл диметилформамида и смешиванием с 2 л 50 мМ Na-фосфатного буфера, pH 7,4, содержащего также 50 мМ NaCl, 0,1% твина и 0,1% NaN_3. Оба эти раствора стабильны при хранении в течение года при 2—8 °C.

Приготовление калибровочных стандартов

Стандартные препараты дигоксина получали на основе нормальной сыворотки крови доноров, не получавших дигоксин в качестве терапевтического средства. В случае тироксина препараты сыворотки обрабатывали углем для удаления эндогенного T_4. Калибровочные стандарты тироксина получали на основе сыворотки, не содержащей T_4. Калибровочные стандарты для анализа ферритина готовили после удаления из человеческой сыворотки эндогенного ферритина с помощью аффинной хроматографии. К полученной таким образом сыворотке, лишенной ферритина, добавляли известные количества препарата, очищенного ферритина из печени человека.

Методики определения

Определение дигоксина проводили непосредственно в образцах сыворотки, которые не нуждались в какой-либо предварительной обработке. Обычно использовали калибровочную кривую в диапазоне концентраций 0—40 нг/л. Ферритин определяли сходным образом — прямо в сыворотке без предварительной обработки. Калибровочную кривую строили в диапазоне концентраций 0—600 нг/мл. В случае определения тироксина необходимо предварительно разбавить образец буфером, содержащим 8-амино-1-нафталинсульфоновую кислоту (АНСК), которая вытесняет тироксин из комплекса со связывающими его белками. Перед внесением проб в прибор Stratus смешивают 50 мкл сыворотки, 20 мкл конъюгата и 200 мкл раствора, содержащего АНСК. Калибровку для тироксина проводили в диапазоне 0—250 мкг/л.

Результаты и обсуждение

Последовательный анализ: дигоксин

Для каждого фильтра, анализируемого с помощью описанного оборудования, в качестве меры ферментативной активности выступает скорость нарастания сигнала, выражаемая обычно в милливольтах в минуту. Типичный набор кривых для серии калибровочных стандартных препаратов дигоксина показан на рис. 20-5. Наибольшая скорость реакции соответствует минимальной концентрации дигоксина в препарате; с ростом концентрации скорость постепенно уменьшается. На основании этих данных строят калибровочную кривую. Определение скорости реакции характеризуется высоким отношением сигнала к фону и линейностью нарастания сигнала на протяжении интервала в несколько минут. Обычно измерение для каждого фильтра продолжается в течение 30 с. Особенно важно отметить чрезвычайно низкую скорость реакции, наблюдаемую для отрицательного контроля (рис. 20-5). Этот контроль представляет собой фильтр, покрытый слоем антител, отличных от антител к дигоксину. Специфическое связывание с таким фильтром невозможно. Чрезвычайно низкая скорость реакции в отрицательном контроле свидетельствует о том, что в системе практически не происходит неспецифического связывания. Стекловолокнистая фильтровальная бумага сама по себе в отношении адсорбции фактически инертна, а после покрытия антителами становится еще более инертной. Некоторые препараты, содержащие полимерные формы конъюгата, могут давать более высокие значения активности в контроле. Однако известны методические подходы, позволяющие получать конъюгаты, практически не содержащие полимерных компонентов. Наблюдаемый низкий уровень фоновой активности является очень важным фактором для сэндвич-анализа, при котором препараты с низкой концентрацией тестируемого компонента характеризуются низкой активностью, и поэтому чувствительность этого анализа может существенно лимитироваться уровнем неспецифического связывания.

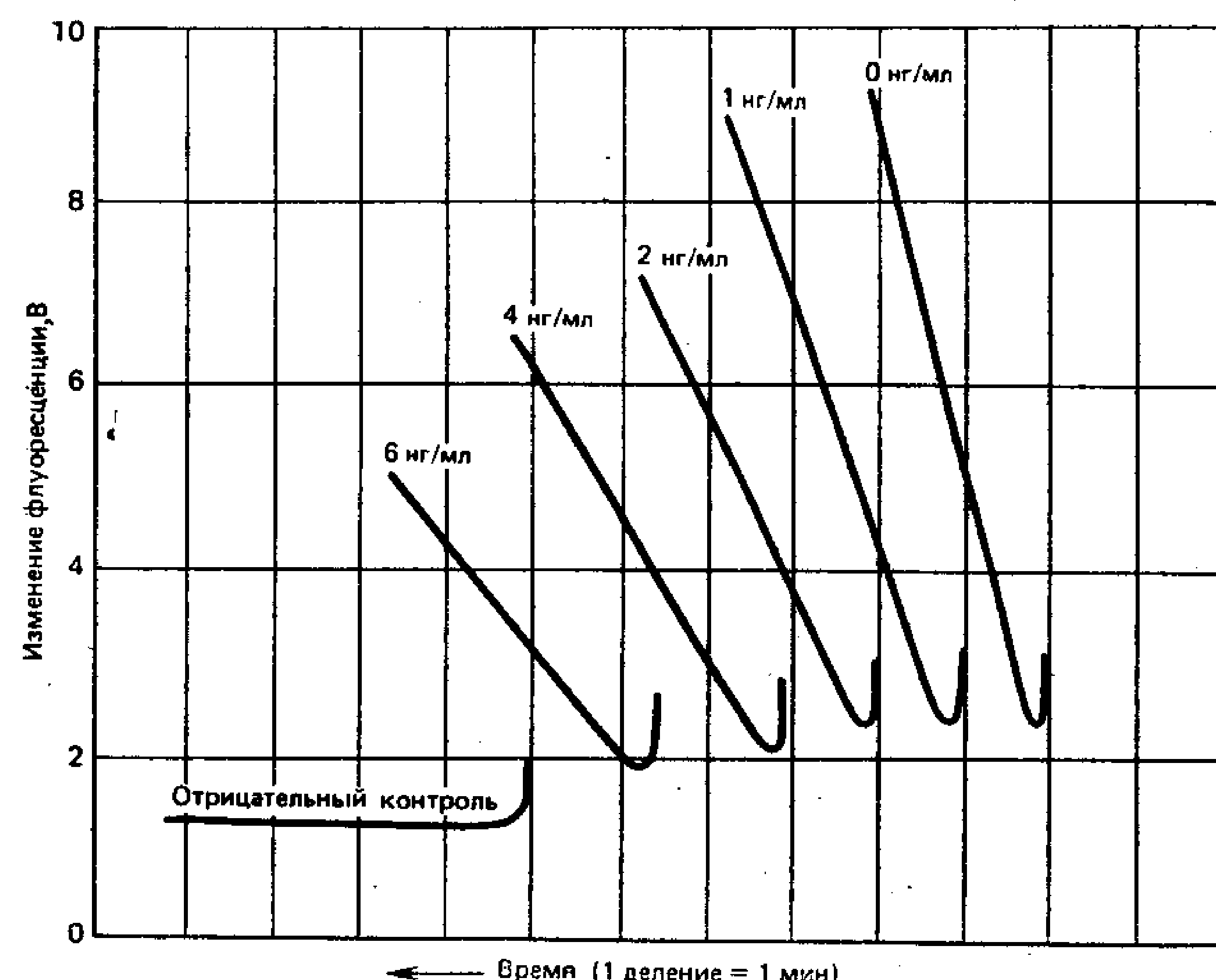


Рис. 20-5. Скорости ферментативной реакции для различных концентраций дигоксина в калибровочных стандартах.

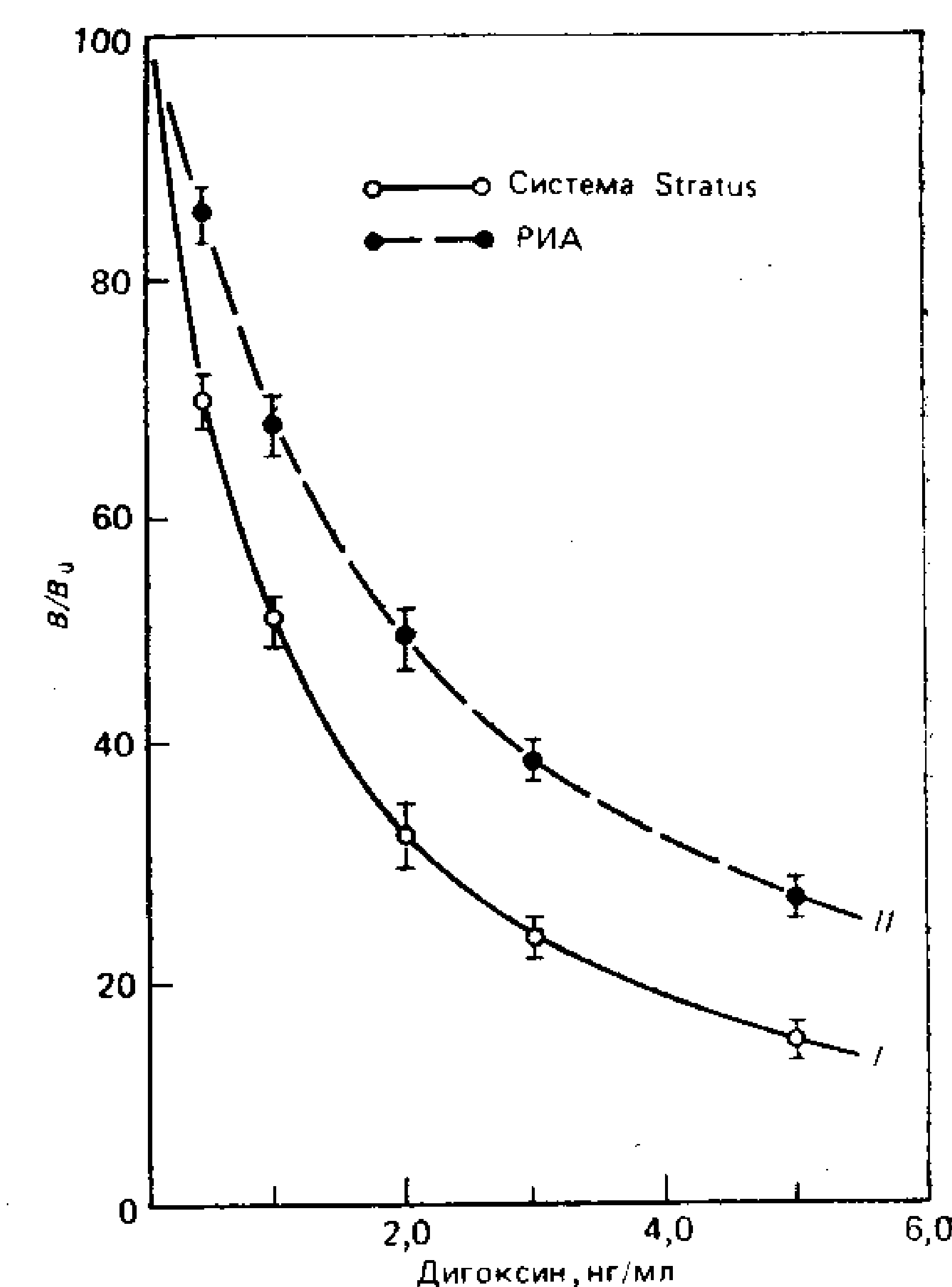


Рис. 20-6. Калибровочные кривые для определения дигоксина, полученные в системе Stratus (*I*) и методом **РИА** (*II*).

На рис. 20-6 скорости реакций, соответствующие кривым на рис. 20-5, представлены в более удобном виде как зависимости величины B/B_0 от концентрации. Для сравнения на рис. 20-6 показана также кривая, полученная традиционным методом с разделением компонентов РИА при добавлении вторых антител. При этом были использованы те же первичные антитела и те же стандарты, что и в опыте, отраженном на рис. 20-5. Видно, что полученные кривые очень сходны между собой.

На рис. 20-7 показана корреляция между данными, полученными с помощью системы Stratus и методом РИА, для целого ряда клинических образцов. Можно отметить весьма хорошее согласование результатов, полученных тем и другим методом. При сравнении результатов определения дигоксина в системе Stratus с результатами, полученными в других системах, была обнаружена вполне удовлетворительная корреляция для целого ряда альтернативных вариантов анализа.

Чтобы установить значение временно́го фактора в данной системе, изучали кинетику связывания как дигоксина, так и конъюгата [дигоксин—фермент] с фильтрами. На рис. 20-8 показана кривая связывания для образца, содержащего 2 нг/мл дигоксина. В этих опытах через указанные на графике промежутки времени после нанесения образца соответствующий фильтр обрабатывали раствором конъюгата. 90%-ное связывание нанесенного дигоксина наблюдали уже спустя 90 с после

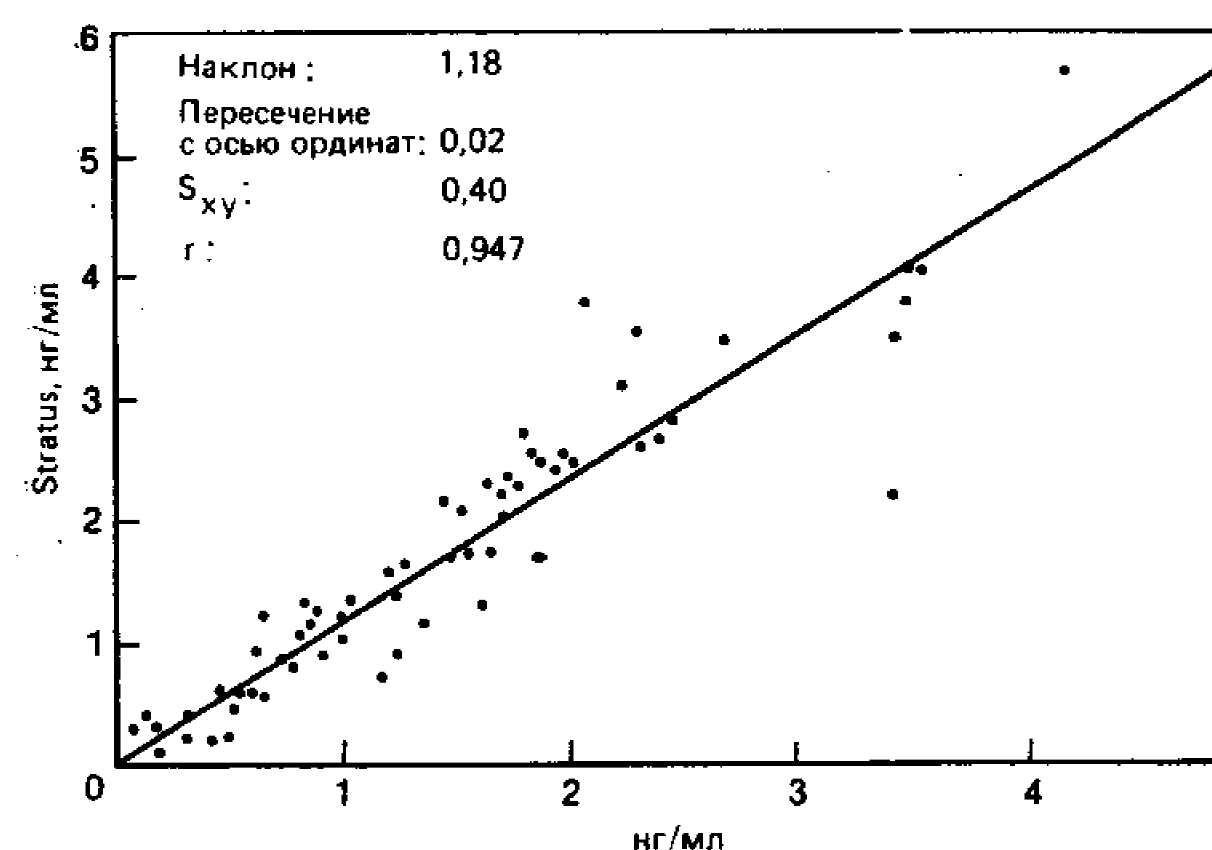


Рис. 20-7. Корреляция между результатами определения дигоксина в клинических образцах с помощью системы Stratus и методом РИА.

нанесения. Таким образом, первая из использованных в системе реакций является достаточно быстрой. На рис. 20-8 отражена также кинетика связывания конъюгата для образцов, не содержащих дигоксина и содержащих его в концентрации 2 нг/мл. В этом случае обработку конъюгатом проводили через 2 мин после внесения образца. Практически 90%-ное связывание конъюгата реализуется менее чем за 4 мин. Некоторые различия в скоростях связывания свободного дигоксина и конъюгата, вероятно, обусловлены существенно бóльшим молекулярным размером последнего.

Поскольку используемый прибор обеспечивает надежный контроль времени, нет необходимости проводить анализ в режиме полного завершения всех реакций. Мы получили достаточно надежные результаты при анализе дигоксина с использованием 2-минутного интервала на первой стадии процесса и 3-минутного — на второй. Однако можно использовать и более короткие интервалы. Так, в последнее время мы получили вполне достоверные результаты определения дигоксина при общей продолжительности анализа 4 мин.

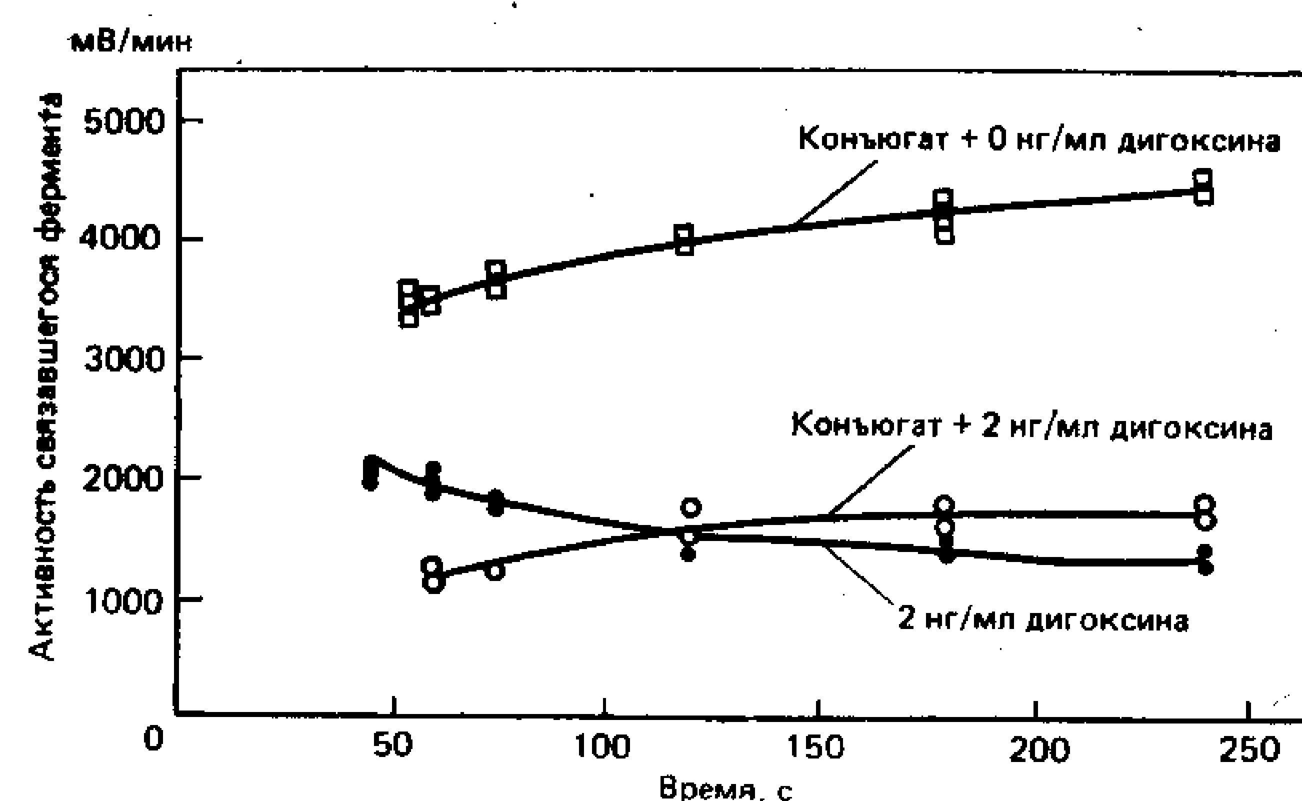


Рис. 20-8. Кинетика связывания свободного дигоксина и конъюгата [дигоксин—фермент] с фильтрами, покрытыми специфическими антителами.

Конкурентный анализ: тироксин

Конструктивные особенности системы Stratus обеспечивают стабильность измерений в течение длительного времени благодаря использованию в качестве внутреннего стандарта устойчивого флуоресцирующего препарата, по которому перед началом цикла измерений осуществляют подстройку, позволяющую скорректировать те или иные сдвиги в работе измерительной системы. Калибровка системы остается стабильной на протяжении не менее двух недель. В табл. 20-1 в качестве примера приведены данные клинического тестирования тироксина за 20-дневный период. Каждый день проводили анализ 48 контрольных образцов на трех различных концентрационных уровнях с тремя повторами для каждого. Это соответствовало 16 циклам. На протяжении всего этого временнóго интервала в системе тестирования не наблюдали никаких смещений и точность определения оставалась очень высокой.

В табл. 20-2 приведены данные, иллюстрирующие точность анализа на примере определения тироксина в 82 образцах с одной и той же серией контролей. Даны характеристики точности анализа как внутри одного цикла, так и между различными циклами определений. Характерно, что значения коэффициентов вариации внутри цикла и между циклами близки между собой, что свидетельствует о крайне небольших сдвигах в системе определения на достаточно протяженном временнóм интервале.

На примере анализа тироксина было проведено дальнейшее сопоставление возможностей различных иммунологических методов. В табл. 20-3 приведены результаты обработки данных, полученных с использованием четырех различных вариантов

Таблица 20-1. Устойчивость калибровочной кривой для тироксина (в течение 20 дней)

	Уровень I	Уровень II	Уровень III
n	48	48	48
Среднее (мкг/дл)	3,815	7,684	14,672
Станд. отклонение (S)	0,254	0,371	0,773
Общий коэфф. вариации (V), %	6,66	4,83	5,27

Таблица 20-2. Точность определения тироксина

	Уровень I	Уровень II	Уровень III
n	82	82	82
Среднее (мкг/дл)	3,640	7,050	15,212
Станд. отклонение (*S*)	0,221	0,266	6,607
Коэф. вариации (*V*) внутри цикла, %	4,18	2,85	3,69
Коэф. вариации (*V*) между циклами, %	4,48	2,53	1,54
Общий коэф. вариации, %	6,06	3,77	3,99

РИА и одного метода, основанного на использовании поляризационной флуориметрии. Для всех пяти методов наблюдались сходные значения наклона корреляционной кривой сравнения с данными радиально-распределительного ИФА. Хорошая корреляция наблюдалась при проведении анализов как в нашей, так и в других лабораториях.

В табл. 20-4 приведен пример обнаружения тироксина. С помощью системы Stratus анализировали два образца сыворотки, содержащие 5, 10 и 15 мкг/дл тироксина. Обнаружение при таком анализе оказывается достаточно высоким. Подобные исследования проводили и на других тестируемых компонентах, для которых также наблюдались аналогичные значения обнаружения.

Было изучено влияние на результаты анализа различных способов получения плазмы. Данные, полученные при анализе тироксина, приведены в табл. 20-5. Содержание тироксина определяли в образцах сыворотки и плазмы, полученных на основе четырех различных препаратов крови. При этом не было обнаружено существенных различий между результатами определения тироксина в сыворотке и различных вариантах

Таблица 20-3. Сравнение методов иммунологического определения тироксина

Методы	*n*	Пересечение	Наклон	*r*	Sy.x
РИА (NML) (в нашей лаб.)	85	0,618	0,93	0,89	0,92
РИА (NML) (в лаб. 1)	124	0,847	0,882	0,92	1,34
Анализ TDx[1] (в лаб. 1)	111	1,38	0,862	0,94	1,23
РИА (Clinical Assays (в лаб. 2)	113	1,04	0,888	0,94	1,39
РИА (NML) (в лаб. 3)	110	0,389	0,930	0,93	1,03

[1]) Фирменное название теста, разработанного в Abbott Labs (Чикаго, Иллинойс).

Таблица 20-4. Определение значений обнаружения при количественном анализе тироксина

Номер образца	Ожидаемое содержание тироксина, мкг/дл	Обнаруженное содержание тироксина, мкг/дл	Обнаружение, %
1	5,0	4,83	96,6
1	10,0	10,43	104,3
1	15,0	14,49	96,6
2	5,0	4,90	98,0
2	10,0	9,77	97,0
2	15,0	14,97	99,8

плазмы. Аналогичные исследования были проведены и для других лекарственных препаратов, в том числе и для дигоксина. Для всех препаратов было установлено, что анализу с равным успехом могут подвергаться как сыворотка, так и плазма. Это обеспечивает большие преимущества в клинической диагностике, поскольку при непосредственном анализе плазмы можно сэкономить время, исключив стадию формирования сгустка.

Сэндвич-анализ: ферритин

Сэндвич-анализ по способу проведения аналогичен последовательному анализу. Образцы вносят в соответствующие пробирки и помещают в прибор. В зоне нанесения конъюгата производится обработка антителами против ферритина, меченными ферментом, а в зоне нанесения субстрата — субстратом. На рис. 20-9 показаны типичные калибровочные кривые для анализа образцов с содержанием ферритина до 600 нг/мл, а также влияние продолжительности периода инкубации на ход калибровочной кривой. Для получения таких данных перемещение фильтров в приборе осуществляли с интервалами 50, 60 и 70 с. Интервалам 50 с соответствуют инкубационный

Таблица 20-5. Эквивалентность сыворотки и плазмы при определении тироксина (усредненные данные для четырех здоровых людей, мкг/дл)

Образец	Сыворотка	Плазма в присутствии				Итого	
		ЭДТА	гепарина	оксалата	цитрата	среднее	коэфф. вариации, %
1	7,28	7,11	7,43	6,96	6,57	7,07	4,2
2	6,44	6,41	6,63	6,08	5,86	6,28	4,4
3	6,67	6,00	6,53	5,79	7,02	6,40	7,0
4	7,31	6,73	7,28	6,59	6,38	6,86	5,4

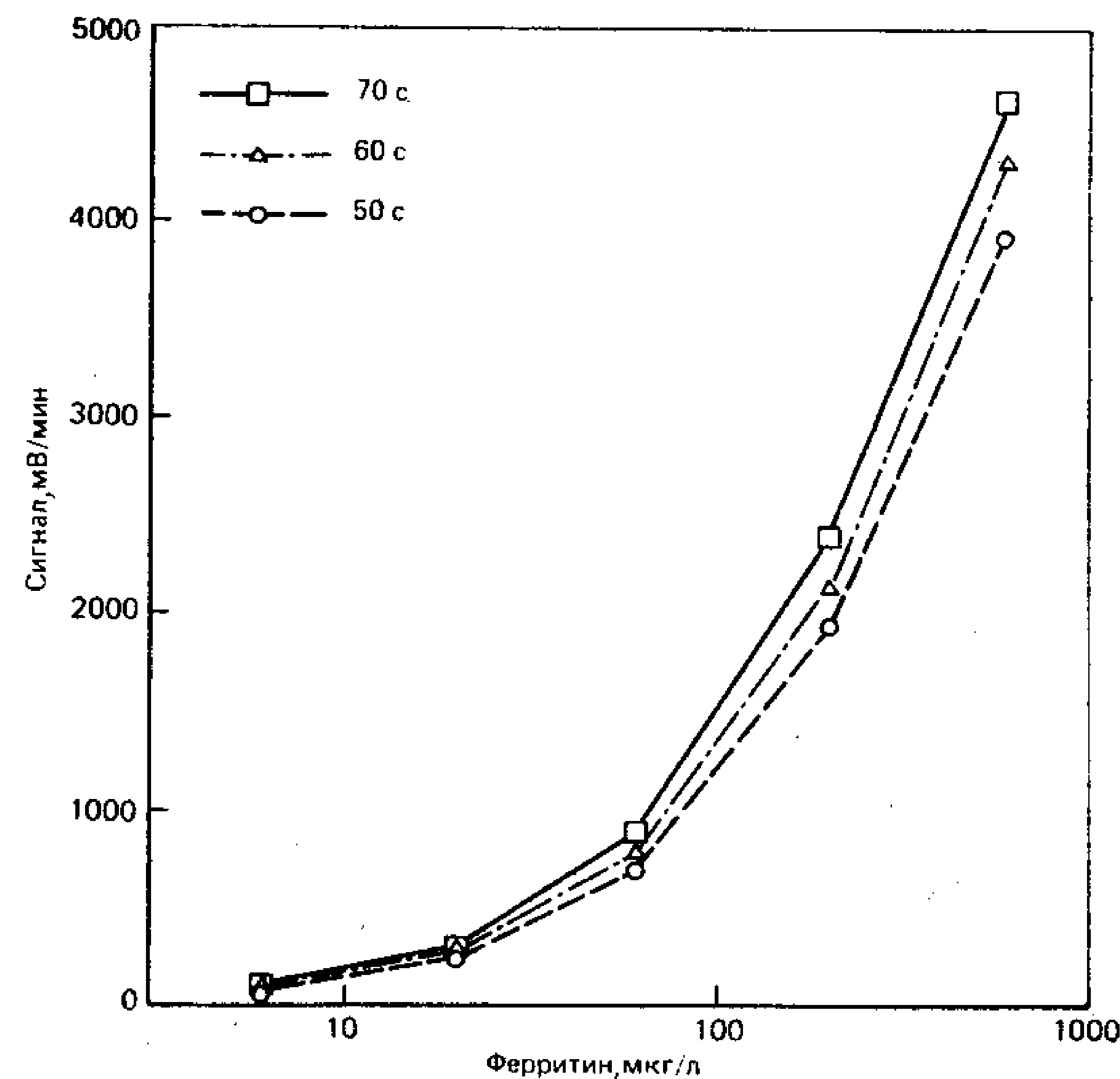


Рис. 20-9. Калибровочные кривые для определения ферритина при использовании различных периодов инкубации.

период первой реакции с антителами против ферритина продолжительностью 100 с и инкубационный период второй реакции с мечеными антителами — 150 с. Для 50-секундных интервалов полное время анализа < 7 мин, для 60-секундных ~8 мин, а для 70-секундных ~9 мин. Существенное влияние продолжительности инкубации на калибровочную кривую заметно лишь в области высоких концентраций ферритина. Изменение интервала от 50 до 70 с в нижней части кривой практически не сказывается на чувствительности анализа. Для дальнейшей работы был выбран режим анализа с шагом 60 с, обеспечивающий достаточно высокую чувствительность определения.

Другим параметром, который может влиять на чувствительность анализа, является концентрация конъюгированных с ферментом антител к ферритину. На рис. 20-10 показан эффект удвоения концентрации конъюгата на ход калибровочной кривой. Анализ проводили с интервалами передвижения 60 с. Наиболее отчетливо влияние концентрации конъюгата проявляется в верхней области кривой. Увеличение концентрации конъюгата сопровождается некоторым ростом фона, что препятствует повышению чувствительности в области низких концентраций ферритина. Оптимальную концентрацию конъюгата подбирали таким образом, чтобы обеспечить максимальную чувствительность в области низких концентраций ферритина,

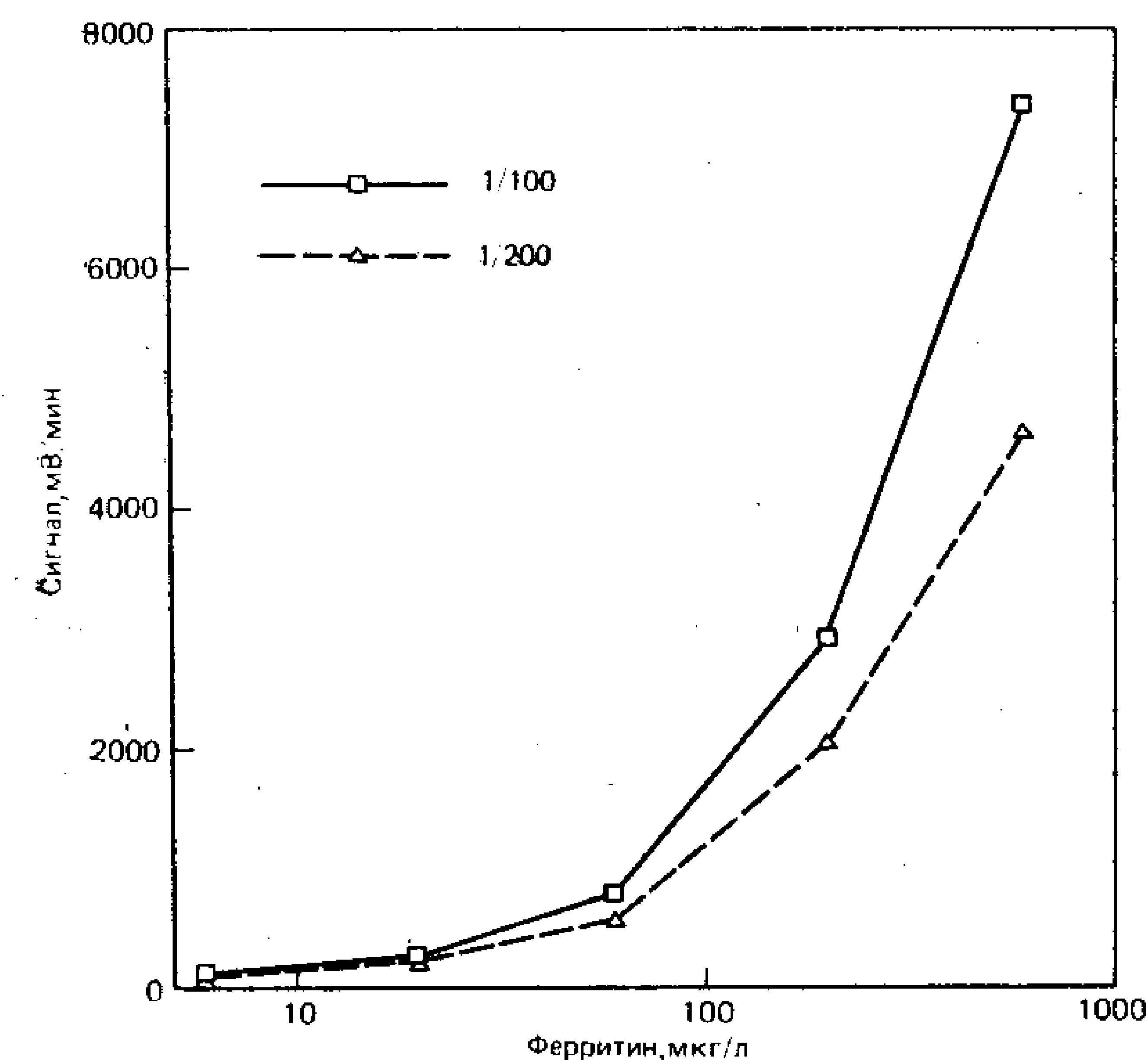


Рис. 20-10. Калибровочные кривые для определения ферритина при использовании двух концентраций конъюгата [антитело—фермент].

сохранив по возможности наиболее динамичный ход кривой при переходе к более высоким концентрациям тестируемого компонента.

Более подробный анализ калибровочной кривой и чувствительности метода дан в табл. 20-6, в которой приведены данные построения калибровочной кривой, повторенной семь раз на протяжении восьми дней. Данные для каждой точки получали с тремя повторами и окончательные результаты рассчитывали в виде средних значений для 21 измерения. Для каждого значения рассчитывали величину стандартного отклонения и оценивали чувствительность по методу Родбарда (Rodbard, 1978). На основании этих расчетов чувствительность метода достигает 0,8 нг/мл. Такой уровень чувствительности вполне удовлетворя-

Таблица 20-6. Стабильность калибровочной кривой ИФА ферритина на протяжении 8 дней[1)]

Число измерений	Концентрация стандартного раствора, мкг/л	Среднее значение сигнала, мВ/мин	Стандартное отклонение
21	0	28,7	6,7
21	6	129	7,5
21	20	407	7,1
21	60	1184	31
21	200	3227	83
21	600	6117	135

[1)] Для каждого цикла калибровки все разведения образца измеряли с 3-кратными повторами. Эту процедуру повторяли 7 раз в течение 8 дней.

Таблица 20-7. Оценка точности и стабильности определения ферритина на протяжении 8 дней[1]

Число измерений	Среднее значение, мкг/л	Стандартное отклонение (S)	Общий коэф. вариации (V), %	V внутри цикла, %	V между циклами, %
28	41,1	1,2	3,0	2,6	1,4
28	127	3,6	2,9	2,1	2,0
28	193	6,1	3,3	1,7	2,8

[1]) В течение 8 дней проводили определение ферритина в 3 контрольных образцах. В каждом цикле для каждого разведения контроля проводили по 4 повторных измерения. Калибровочную кривую строили на основании 7 циклов измерений.

ет потребностям клинического анализа и позволяет точно определять ферритин в растворах с низкой концентрацией. В табл. 20-6 продемонстрирована иключительно высокая стабильность системы определения в целом. На протяжении 8 дней не наблюдалось никаких сдвигов в результатах анализа, что свидетельствует как о стабильном характере работы, так и о стабильности реагентов.

При рутинном использовании сэндвич-анализ, судя по всему, обладает более высокой точностью определения, чем последовательный или конкурентный. В табл. 20-7 представлены данные, характеризующие точность и стабильность определения ферритина в трех контрольных образцах за 8-дневный период. Для каждого контроля в каждом цикле осуществляли измерения с четырьмя повторами; при этом коэффициент вариации составлял примерно 3%. Повышенная точность сэндвич-анализа, по-видимому, связана с тем, что каждый анализируемый фильтр покрывают значительным избытком антител, так что небольшие изменения в самом процессе создания покрытия практически не сказываются на конечном результате. В то же время для последовательного и конкурентного вариантов анализа количество материала при первичной обработке фильтра должно быть строго одинаковым. Для этих двух видов анализа даже небольшие колебания в количестве нанесенных на фильтр антител будут приводить к ощутимому проигрышу в точности определения.

Для оценки так называемого «эффекта загиба» в области высоких концентраций, описанного в работе Майлза и др. (Miles et al., 1974), анализировали образцы очищенного печеночного ферритина человека в концентрации до 192 000 нг/мл. Данные, представленные на рис. 20-11, свидетельствуют о том, что плато на кривой титрования начинается при концентрации ферритина в образце ~10 000 нг/мл. В то же время даже при концентрации 192 000 нг/мл снижение сигнала (эффект загиба) не наблюдается. В работе Нго и др. (Ngo et al., 1983) сообщается, что в клинических образцах содержание ферритина может

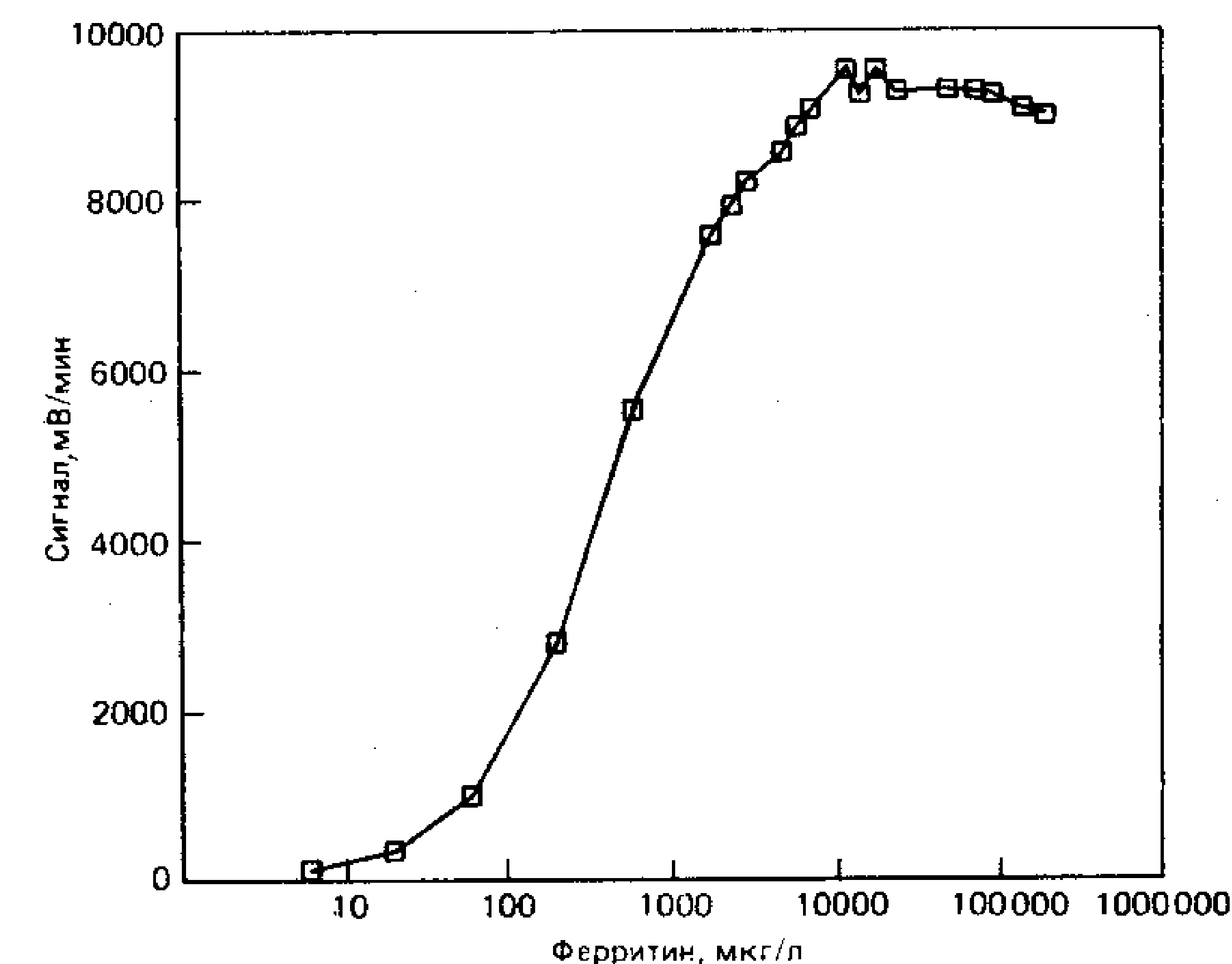


Рис. 20-11. Калибровочная кривая определения ферритина, на которой отсутствует загиб в области высоких концентраций тестируемого компонента.

достигать 47 000 нг/мл, и, следовательно, отсутствие эффекта загиба является важной характеристикой данного метода анализа. В используемом нами режиме можно достоверно определять содержание ферритина при концентрации в образце до 1000 нг/мл, сохраняя при этом достаточно высокую чувствительность при тестировании в области низких концентраций. Рабочий диапазон концентраций, доступный для непосредственного тестирования с помощью разработанного нами метода, является одним из наиболее широких среди описанных в литературе концентрационных диапазонов определения ферритина.

Появление загиба может быть связано с влиянием двух факторов, одним из которых является конкуренция в условиях избытка антигена за связывание со вторыми (меченными ферментом) антителами. В случае радиально-распределительного анализа этот процесс сводится к минимуму или даже полностью подавляется, поскольку в процессе внесения в систему раствора конъюгата [фермент—антитело] происходит вымывание избытка антигена, не связавшегося с антителами на первой стадии процесса. Вторым фактором, ответственным за появление загиба, может служить частичная потеря в ходе проведения второй стадии антигена, связавшегося на первой стадии. Поскольку в нашем случае вторая реакция протекает менее чем за три минуты, возможные потери связавшегося антигена должны быть минимальными.

Обсуждение

Показано, что радиально-распределительный вариант ИФА является весьма совершенным методом иммунологического ана-

лиза, удачно сочетающим быстроту проведения с высокой чувствительностью определения. Этот метод легко применим для анализа как высокомолекулярных, так и низкомолекулярных лигандов. Высокая скорость протекания реакций, вероятно, обусловлена совокупностью нескольких факторов. Фильтровальная бумага имеет очень развитую поверхность. Согласно расчетам, отношение площади поверхности к объему для фильтровальной бумаги в 2000 раз выше, чем для пробирок, покрываемых слоем антител. Кроме того, при использовании фильтровальной бумаги благодаря диффузии расстояния между лигандами и антителами могут оказаться чрезвычайно малыми. Среднее расстояние между волокнами фильтра составляет 1 мкм, что обеспечивает весьма тесный контакт между молекулами реакционной смеси и локализованными на твердой фазе молекулами антител.

Кроме всего прочего для осуществления первой стадии в последовательном и сэндвич-анализе не требуется дополнительного разведения образцов. Процесс вымывания на соответствующем этапе анализа является весьма эффективным и позволяет практически полностью удалить несвязавшиеся компоненты тестируемой смеси. Это обеспечивает низкий уровень фоновой активности и в сочетании с весьма незначительным неспецифическим связыванием с фильтрами, покрытыми антителами, позволяет достичь высокой чувствительности определения. Дополнительным фактором, обеспечивающим высокую чувствительность метода, является использование флуориметрического способа определения активности индикаторного фермента.

В нашей лаборатории в настоящее время разрабатываются аналогичные методы анализа для ряда лигандов, в том числе для обнаружения в сыворотке поверхностного антигена вируса гепатита, а также для количественного определения ХГТЧ, ТТГ и КК-МВ. Кроме того, рассматриваются возможности применения метода для обнаружения раковых антигенов и для решения ряда серологических и микробиологических задач.

Литература

Giegel J. L., Brotherton M. M., Cronin P. et al. (1982). Radial partition immunoassay, Clin. Chem., **28**, 1894—1898.
Granick S. (1942). Ferritin I. physical and chemical properties of horse spleen ferritin, J. Biol. Chem., **14**, 451—461.
Ishikawa E., Imagawa M., Hashida S. et al. (1983). Enzyme labeling of antibodies and their fragments for enzyme immunoassay, J. Immunoassay, **4**, 209.
Miles L. E. M., Lipschitz D. A., Bieber C. P., Cook J. D. (1974). Measurement of serum ferritin by a 2-site immunometric assay, Anal. Biochem., **61**, 209—224.
Ngo R. H., Brown B. A., Valdes R., Jr. (1983). Three commercial methods for serum, Clin. Chem., **25**, 326—329.
Rodbard N. (1978). Statistical estimation of the minimal detectable concentration ("sensitivity") for radioligand assay, Anal. Biochem., **90**, 1—12.
Smith T. W., Butler V. P., Haber E. (1970). Characterization of antibodies of high affinity and specificity for the glycoside digoxin, Biochem., **2**, 331.

Глава 21

Разработка методов иммунохимического анализа изоферментов сердца

Р. Викс, М. Усатеги-Гомес

Введение

Сведения о лактатдегидрогеназе

Изоферментами называют белки, различные по структуре, но катализирующие одну и ту же химическую реакцию. О существовании такого рода структурной гетерогенности у ферментов стало известно уже несколько десятилетий назад (Vessell, Bearn, 1958; Cahn et al., 1962; Markert Appella, 1963; Nisselbaum Bodansky, 1963). В последние несколько лет обнаружение различных изоферментов приобрело особое значение в практике клинических лабораторий. Это связано с открывающимися диагностическими возможностями, обусловленными тем, что «изоферментный профиль», как оказалось, является специфичной характеристикой различных тканей и органов. В тех случаях, когда из-за поражения того или иного органа или ткани в кровотоке появляются характерные изоферменты, их обнаружение часто может помочь верно поставить диагноз и локализовать соответствующее поражение. Так, после инфаркта миокарда происходит выброс в кровь ферментов миокарда — лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и креатинкиназы (КК). На основе различий в иммунохимических свойствах изоферментов лактатдегидрогеназы и креатинкиназы нам удалось разработать простые, быстрые и точные методы иммуноферментного определения специфических изоферментов миокарда.

Лактатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.27) присутствует в сыворотке крови человека в пяти изоферментных формах, каждая из которых представляет собой тетрамер, образующийся из двух типов мономерных субъединиц. Пять изоферментов — это пять возможных тетрамерных комбинаций из субъединиц типа Н (от англ. heart-derived, т. е. преимущественно синтезируемых сердечными тканями) и типа М (от англ. skeletal muscle derived — преимущественно синтезируемых скелетными мышцами). Их состав выражается формулами H_4, H_3M, H_2M_2, HM_3 и M_4. В клинических лабораториях принято классифицировать изоферментные формы на основе их электрофоретической подвижности. Изофермент, быстрее других мигрирующий к аноду, обозначают ЛДГ-1 (он имеет состав H_4). Наименьшей скоростью миграции характеризуется изофермент состава M_4, обозначаемый ЛДГ-5. Считают, что синтез различных субъеди-

ниц детерминируется различными генами. Было высказано предположение, что субъединицы обоих типов включаются в тетрамерную структуру молекулы ЛДГ статистически, независимо друг от друга (Markert et al., 1963). Таким образом, характерный изоферментный профиль, столь важный для клинической диагностики, определяется относительным уровнем синтеза субъединиц каждого типа в тех или иных тканях.

Было тщательно изучено взаимодействие изоферментов ЛДГ с антисыворотками, полученными при иммунизации коз или кроликов высокоочищенными препаратами ЛДГ-1 или ЛДГ-5 человека или макака-резуса (Markert, Appella, 1963; Nisselbaum, Bodanzky, 1963; Burd et al., 1973 a, b). Антитела против ЛДГ-1 не дают перекрестной реакции с ЛДГ-5 и наоборот, при этом гибридные тетрамеры ЛДГ-2, ЛДГ-3 и ЛДГ-4, как и следовало ожидать, реагируют с антителами обоих типов.

Первые иммунохимические методы определения ЛДГ-1

Антитела против высокоочищенного изофермента лактатдегидрогеназы M_4 из мышечных тканей макака-резуса специфически ингибируют ферментативную активность очищенных изоформ ЛДГ человека пропорционально содержанию в них М-субъединиц (Burd et al., 1973a). Это свидетельствует о присутствии в тетрамере четырех функционально активных центров. Берд и др. (Burd et al., 1973a) разработали очень простой тест, основанный на ингибировании активности всех субъединиц типа М в препаратах сыворотки пациентов. Определяя в этом тесте с высокой достоверностью и точностью относительное содержание Н-субъединиц в сыворотке, авторы смогли надежно выявлять больных, перенесших инфаркт миокарда. Полученные результаты очень хорошо коррелировали с данными электрофоретического анализа. Проводились также опыты по преципитации изоферментов ЛДГ человека с использованием антисывороток против изоформ H_4 и M_4 человека (Boll et al., 1974). Было найдено, что антисыворотка против M_4 преципитирует все изоформы ЛДГ, содержащие хотя бы одну М-субъединицу, а антисыворотка против H_4 — изоформы ЛДГ, содержащие хотя бы одну Н-субъединицу в присутствии полиэтиленгликоля. Авторам удалось определить в экстрактах различных тканей содержание изоформ H_4, M_4 и общее содержание смешанных изоформ фермента. Такой подход, однако, нельзя признать удобным для рутинного определения изоферментного состава.

Разработка иммунохимического анализа ЛДГ-1

Очистка ЛДГ-5. Процедура очистки M_4 из печени человека подробно описана (Burd et al., 1973a). Солюбилизации лактатдегидрогеназы достигают при растирании ткани с последующей высокоскоростной обработкой в гомогенизаторе Уоринга. После удаления клеточных остатков гомогенат подвергают очистке с использованием солевой преципитации и хроматографического фракционирования в несколько стадий, перечисленных в табл. 21-1. Полученный препарат характеризуется высокой степенью очистки и изоферментной однородностью. *Получение первичных и вторичных антител.* Новозеландским белым кроликам-самцам инъецируют препараты M_4 человека в полном адъюванте Фрейда. Препарат (1—2 мг на одного кролика) вводят четырьмя равными порциями в каждую из подушечек на лапках. Каждые три недели (на 21-й и 23-й день) осуществляют дополнительную иммунизацию (по 1 мг препарата). Кровь собирают через 10 дней после дополнительной иммунизации. Иммунизацию коз проводят по той же схеме, используя 5-кратное количество ферментного антигена.

Таблица 21-1. Очистка изофермента ЛДГ-5 из печени человека

Этап	Белок, мг	Уд. активность, ед./мг	Очистка
1. Гомогенат	125 000	521	—
2. Фосфат кальция	32 700	1 560	3,0
3. Сульфат аммония	9 300	3 420	6,6
4. КМ-сефадекс	1 190	23 700	45,5
5. ДЭАЭ-сефадекс	81,9	233 000	446
6. Сефадекс G-100	62,5	240 000	460

Ослиные антитела против γ-глобулинов козы конъюгируют с поливинилиденфторидными волокнами (Newman et al., 1980). Содержание конъюгата [полимер—антитела] составляет 10% в 20 мМ трис-буфере, pH 7,5, содержащем также 1 г/л азида натрия и 5 г/л БСА. Емкость по связыванию козьих IgG составляет ~30 мкг/мл. Ослиные антитела получают после иммунизации препаратом хроматографически очищенных козьих IgG в полном адъюванте Фрейнда. Преципитационный анализ показывает, что в полученной сыворотке содержится 6 мг/мл специфически преципитирующих иммуноглобулинов.

Характеристики антисывороток. Препараты антисывороток, полученные от различных животных и (или) в различных циклах забора крови, существенно различались по иммунохимическим свойствам. Во всех препаратах антисывороток присутствовали смеси ингибирующих и преципитирующих антител, однако титры сывороток, оцениваемые по ингибированию фермента, у разных доноров были различны. На рис. 21-1, *А* приведен пример титрования антисыворотки с низким ингибирующим титром. После добавления 20 мкл антисыворотки изофермент

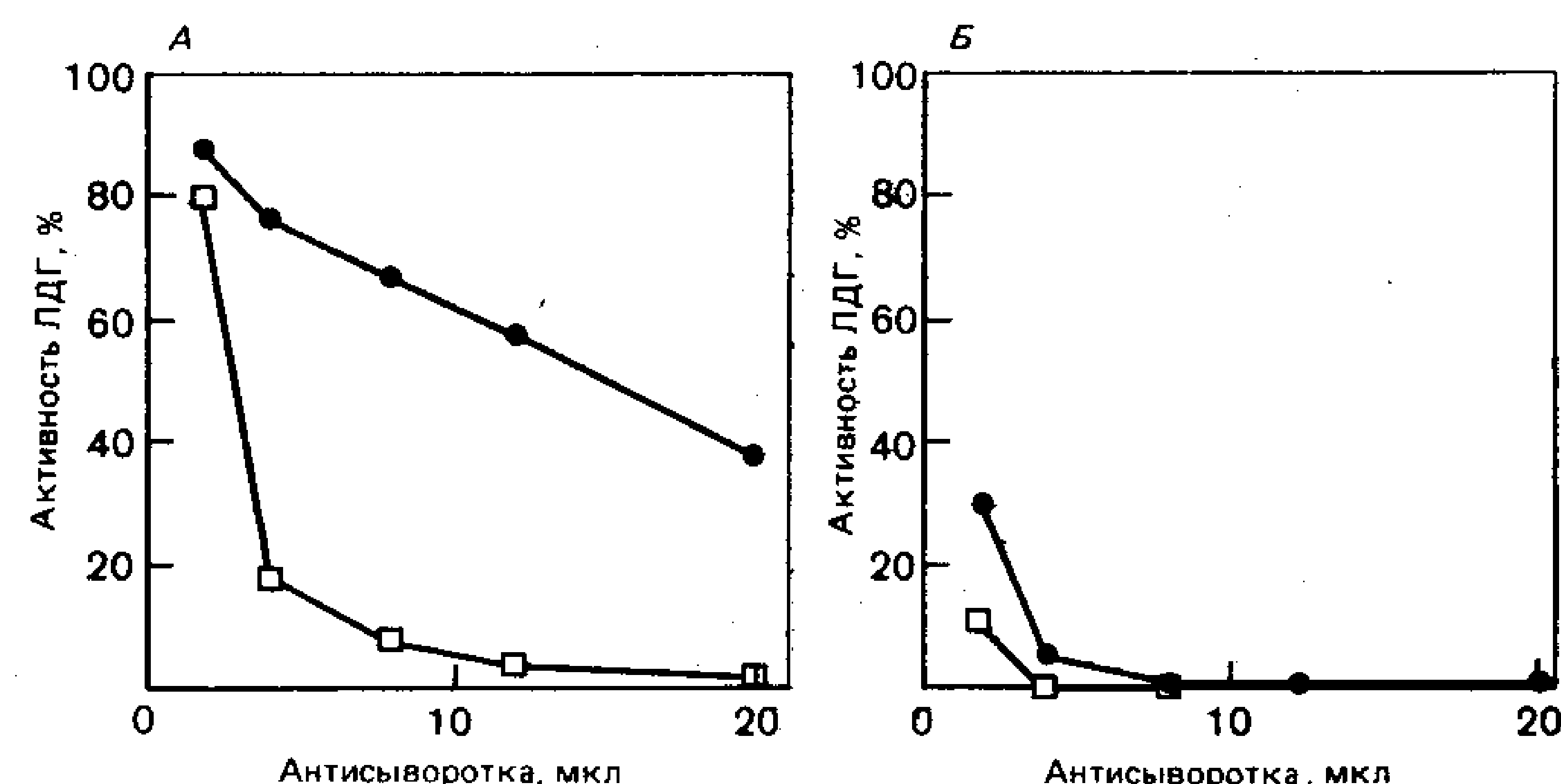


Рис. 21-1. Сравнение кроличьих антисывороток с низким (*А*) и высоким (*Б*) титром ингибирования. Различные количества антисыворотки инкубировали с M_4 человека в течение ночи. Активность фермента измеряли до (темные кружки) и после (светлые квадраты) центрифугирования при 2500 *g* в течение 30 мин.

M_4 сохранял около 40% исходной активности. В то же время добавление 10 мкл той же сыворотки оказывалось достаточным для удаления основной массы этого изофермента из раствора. На рис. 21-1, *Б* показаны результаты, полученные при работе с антисывороткой, обладающей высокой ингибирующей активностью. Добавление менее 5 мкл такой сыворотки оказывается достаточным для полного ингибирования и преципитации присутствующего в растворе изофермента. Таким образом, для каждой новой полученной порции антисыворотки необходимо тщательно анализировать соотношение ингибирующей и преципитирующей активности. Хороший контроль качества антисыворотки необходим для обеспечения достоверности и эффективности анализа.

Была тщательно изучена степень ингибирования очищенных изоферментов ЛДГ человека антителами против M_4. Исследовалось также влияние антисыворотки на активность пяти изоферментов ЛДГ человека по превращению как лактата в пируват, так и пирувата в лактат. Как показано на рис. 21-2, степень ингибирования изоферментов пропорциональна относительному содержанию М-субъединиц независимо от используемого варианта тестирования.

Методика анализа. Аликвоту козьей антисыворотки против ЛДГ-5 (50 мкл), разведенной трис-буфером, добавляют к 200 мкл тестируемой сыворотки, осторожно перемешивают и инкубируют 5 мин при комнатной температуре. Затем добавляют 200 мкл конъюгата [полимер—вторые антитела], перемешивают и инкубируют еще 5 мин при комнатной температуре. Нерастворимый комплекс, включающий все изоформы ЛДГ,

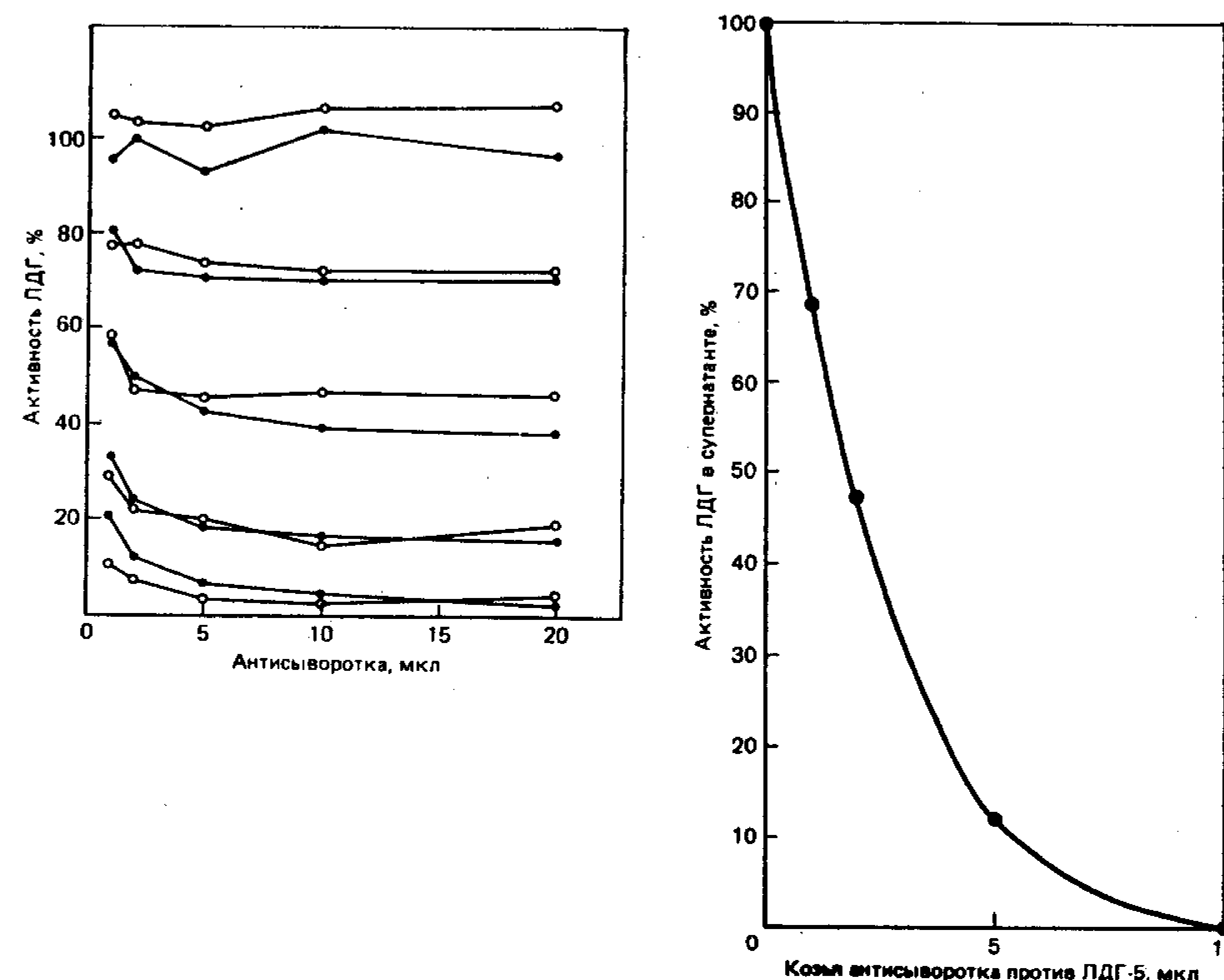


Рис. 21-2. Ингибирование активности изоферментов лактатдегидрогеназы человека при действии козьей антисыворотки против M_4 обезьяны. Активность фермента определяли по превращению лактата в пируват (темные кружки) и пирувата в лактат (светлые кружки).

Рис. 21-3. Зависимость преципитации лактатдегидрогеназы (ЛДГ-5) от количества добавленной антисыворотки. Различные аликвоты козьей антисыворотки против ЛДГ-5 (разведение 1 : 20) инкубировали с препаратом очищенной ЛДГ-5 человека в течение 5 мин. После добавления иммобилизованных на нерастворимом носителе ослиных антител против иммуноглобулинов козы и отделения образующихся иммунокомплексов с помощью центрифугирования в супернатантах определяли остаточную активность фермента.

содержащие М-субъединицы, удаляют центрифугированием 5 мин при 1000 *g*. В супернатанте определяют активность ЛДГ-1, используя соответствующий набор реагентов.

Количество козьей антисыворотки должно быть достаточным для того, чтобы обеспечить полную преципитацию очищенного изофермента ЛДГ-5 при его концентрации в растворе 500 МЕ/л. На рис. 21-3 показано влияние добавления различных объемов козьей антисыворотки против ЛДГ-5 на полноту осаждения очищенного изофермента ЛДГ из раствора. Достаточным является такое количество антисыворотки, после добавления кото-

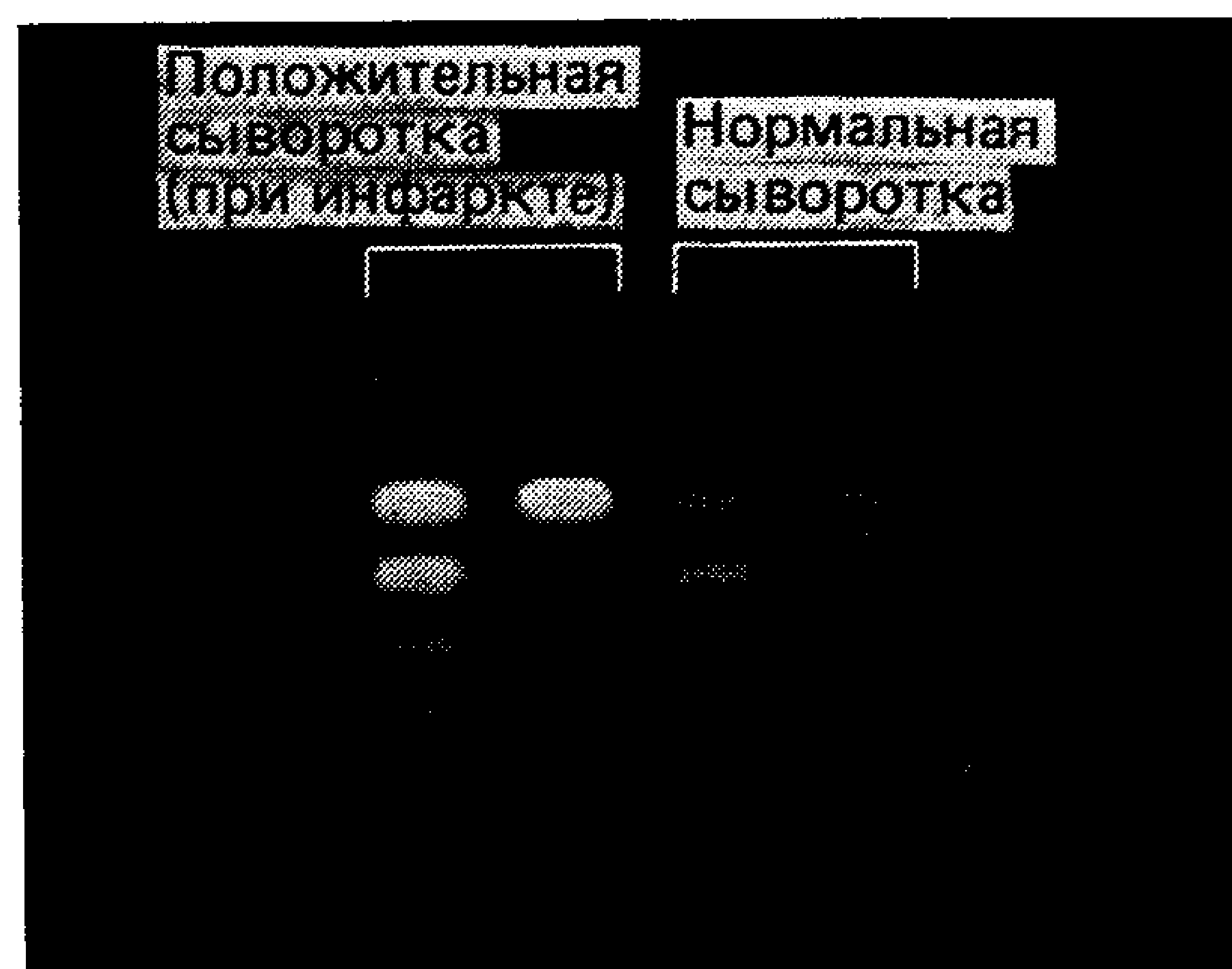


Рис. 21-4. Электрофоретическое разделение изоферментов ЛДГ, содержащихся в образцах нормальной сыворотки и сыворотки больного с инфарктом миокарда, до и после обработки первыми и вторыми антителами.

рого изофермент оказывается полностью связанным; при этом в супернатанте после удаления центрифугированием комплекса [антитела — ЛДГ-5] ферментативной активности не обнаруживается. На рис. 21-4 проиллюстрирована эффективность процесса иммунологического отделения ЛДГ-1 от четырех других изоферментов. На электрофореграмме супернатантов, полученных после центрифугирования образцов положительной (инфаркт миокарда) и нормальной сыворотки, обработанных антисывороткой против ЛДГ-5, видно, что все изоферментные формы, содержащие М-субъединицы, отсутствуют.

Уже с начала 50-х годов электрофоретический анализ считается классическим методом определения изоферментов ЛДГ. Мы провели опыты по проверке корреляции между данными определения ЛДГ-1 с помощью двух независимых методов анализа. Как видно на рис. 21-5, между результатами иммунохимического и электрофоретического анализов наблюдается хорошая корреляция. Отличие наклона регрессионной прямой от единицы можно, вероятно, объяснить некоторыми различиями в сродстве к субстрату изоформ ЛДГ-1 и ЛДГ-5. Само собой разумеется, что в растворе для проявления одной электрофореграммы не может содержаться лактат одновременно в нескольких различных концентрациях. В действительности величина наклона корреляционной кривой в каждом случае определяется непосредственно теми реагентами, которые используются для определения активности ЛДГ-1 в растворе и для проявления электрофореграмм.

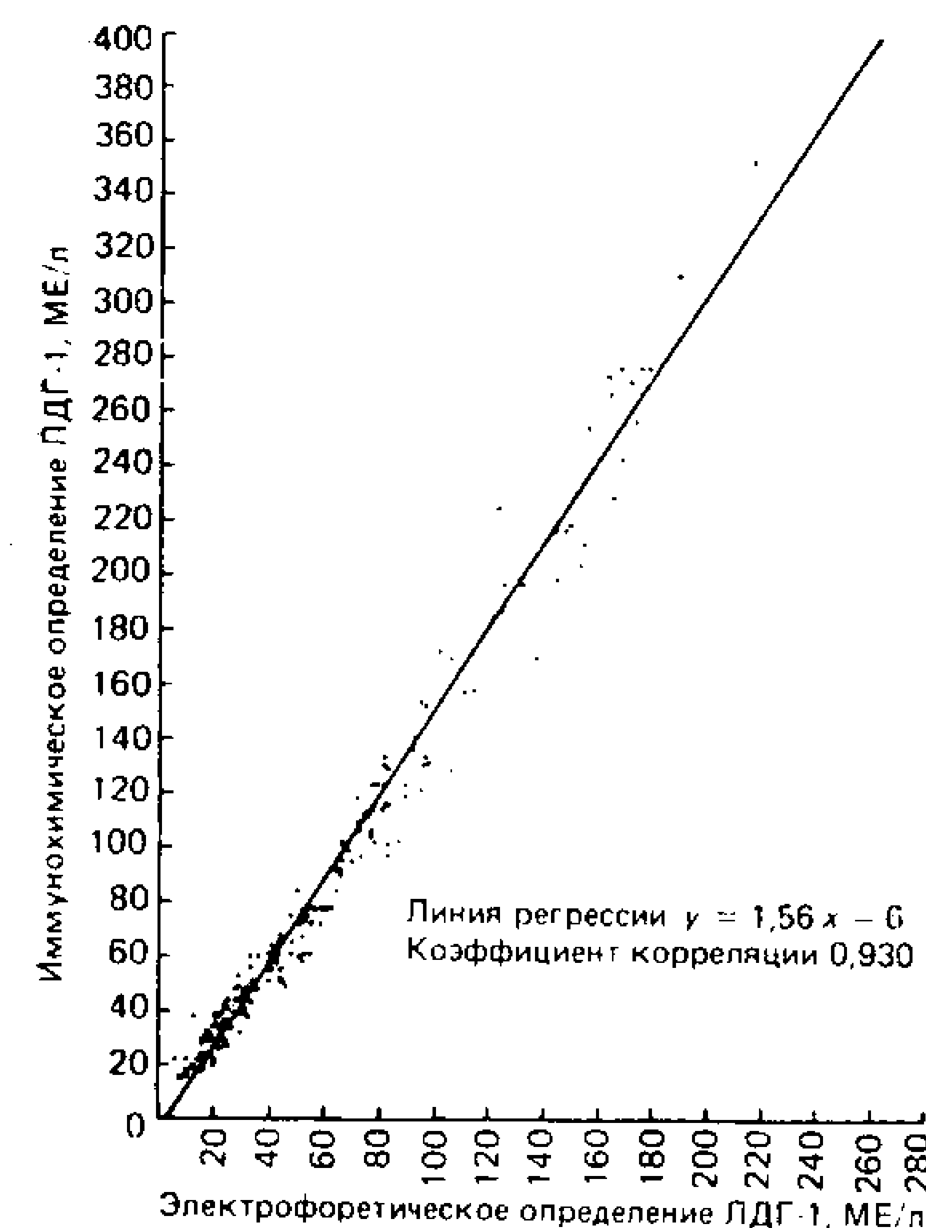


Рис. 21-5. Корреляция результатов иммунохимического и электрофоретического определения ЛДГ-1.

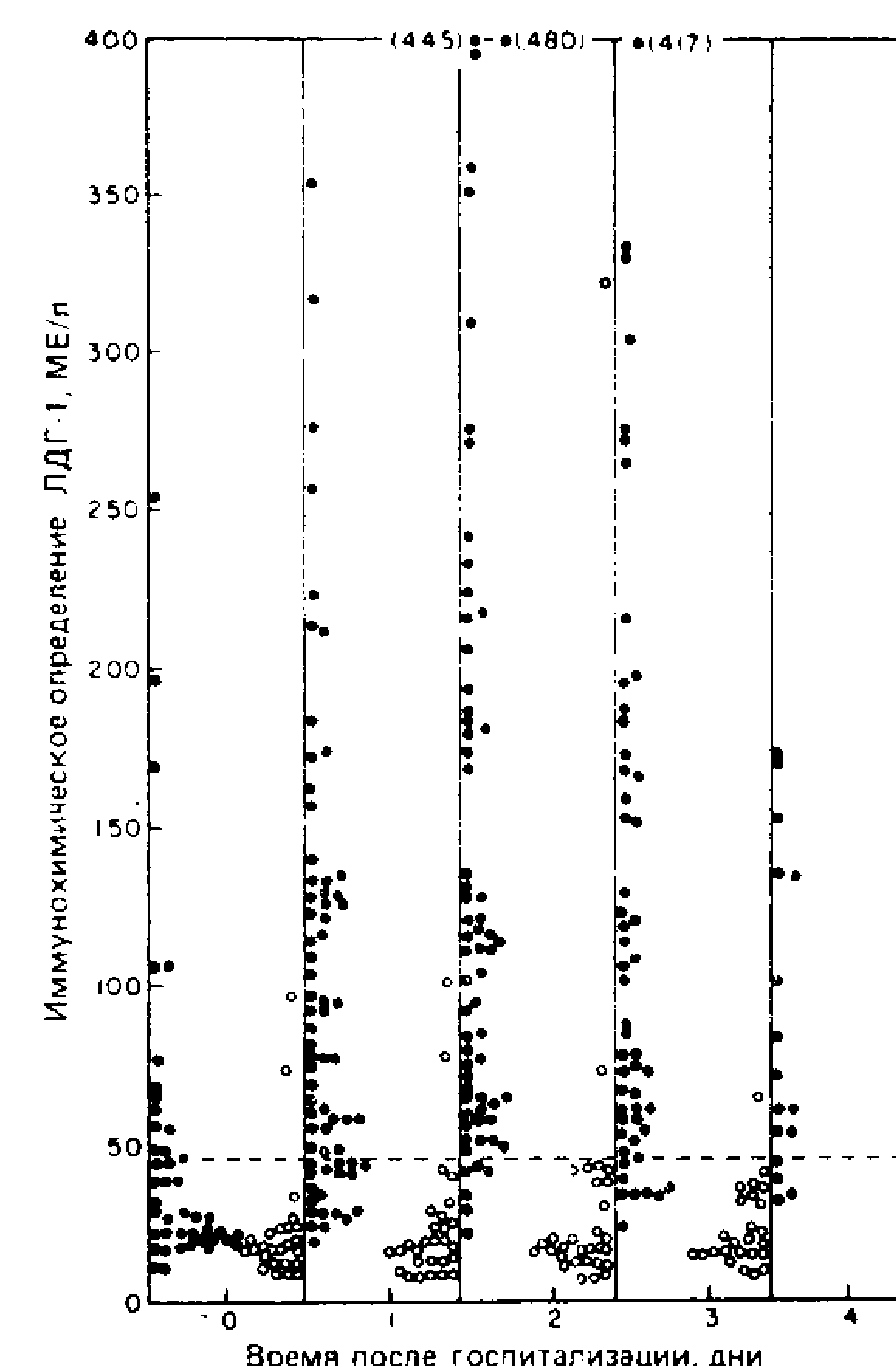


Рис. 21-6. Активность ЛДГ-1 в образцах сыворотки, полученных от больных с инфарктом (темные кружки) и без инфаркта (светлые кружки) в день поступления в клинику и в последующие 4 дня. Прерывистой линией показан выбранный «пороговый» уровень активности (43 МЕ/л).

Клинические исследования

Известно множество публикаций различных авторов по использованию иммунохимического определения ЛДГ-1 (фирменное название теста Isomune LD^R) для диагностики инфаркта миокарда. Все они, без исключения, подтверждают, что данный вариант иммунохимического тестирования ЛДГ-1 является быстрым, точным и надежным методом анализа, обеспечивающим высокую избирательность и чувствительность при диагностике инфаркта. На рис. 21-6 проиллюстрировано клиническое использование анализа ЛДГ-1 на данных, впервые представленных в публикации Усатеги-Гомес и др. (Usategui-Gomez et al., 1979). Максимальная избирательность тестирования обнаруживается в пробах, взятых на второй день после инфаркта. В то же время у многих больных диагностически значимый уровень ЛДГ-1 наблюдается уже в первый день и даже в момент поступления в клинику. Бранс и др. (Bruns et al., 1981) проводили тщательное определение уровня ЛДГ-1 у 65 поступивших

в кардиологическое отделение клиники. Пробы крови брали с момента госпитализации с 4-часовыми интервалами в течение 24 ч и с 12-часовыми интервалами в течение второго дня пребывания в клинике. К двенадцатому часу результаты определения ЛДГ-1 были положительны в 90% случаев, а на 24-м часу положительную реакцию регистрировали во всех пробах. В этом исследовании авторами было установлено, что такой параметр, как отношение уровня ЛДГ-1 к общему уровню ЛДГ, является более надежным и чувствительным для диагностики инфаркта миокарда, чем абсолютное значение уровня ЛДГ-1. Так, отношение уровня ЛДГ-1 к общему уровню ЛДГ остается повышенным в продолжение нескольких дней после инфаркта, в то время как 40% результатов тестирования КК-МВ возвращались к норме за 48 ч после госпитализации.

В работе Фог-Андерсона и др. (Fogh-Anderson et al., 1982) представлены данные по определению ЛДГ-1 у 113 больных, поступивших в клинику с подозрением на инфаркт миокарда. Пробы крови брали при поступлении, а также утром на 1, 2, 3, 5 и 7-й день после госпитализации. В этой группе больных максимальная избирательность тестирования наблюдалась на 2-й и 3-й день, при этом чувствительность достигала 97%, а специфичность анализа 95% и 98% соответственно. Даже на 5-й день чувствительность сохранялась на уровне 97% при специфичности около 90%. По мнению авторов, использование отношения уровня ЛДГ-1 к общему содержанию ЛДГ не дает каких-либо преимуществ. На основании полученных результатов они предлагают внедрить в клиническую практику программу анализов для больных с подозрением на инфаркт миокарда, основанную на определении креатинкиназы (КК-МВ) и ЛДГ-1.

Мак-Кой и др. (Mc Coy et al., 1983) проанализировали образцы сыворотки 85 больных, полученные в момент госпитализации и спустя 12, 24 и 48 ч. Результаты определения ЛДГ-1 в такой серии образцов характеризовались уровнями чувствительности 43%, 84%, 95% и 100% соответственно и специфичностью 95%, 100%, 97% и 97% соответственно.

Как уже отмечалось выше, дискуссионным остается вопрос о том, какой из параметров — абсолютный уровень ЛДГ-1 или отношение уровня ЛДГ-1 к общему содержанию ЛДГ — является наиболее надежным для диагностики инфаркта. В одной из работ (Gerhardt et al., 1983) отмечается, что отношение ЛДГ-1/ЛДГ имеет явные преимущества при диагностике микроинфаркта у больных с конститутивно низким уровнем ЛДГ. Однако в той же работе показано, что в целом ряде случаев общий уровень ЛДГ может существенно повышаться вне всякой связи с инфарктом, например при сердечной недостаточности с печеночным стазом. Это в свою очередь приведет к снижению величины искомого отношения и появлению ложных отрицательных ответов. Полученные в этой работе результаты свидетельствуют о том, что абсолютный уровень ЛДГ-1 является диагностически более надежным параметром, чем отношение уровня ЛДГ-1 к общему содержанию ЛДГ.

Али и др. (Ali et al., 1981) приводят в своей работе данные для 100 больных, поступивших в клинику с подозрением на инфаркт миокарда. При этом особый интерес вызывает проведенное авторами сравнение затрат времени на иммунохимическое определение ЛДГ-1 и электрофоретический анализ. Для анализа 100 образцов сыворотки с помощью теста Isomune LD потребовалось 320 мин, а с помощью электрофореза — 548 мин. Таким образом, использование иммунохимического анализа позволяло сэкономить 3 ч 48 мин на каждые 100 образцов. При определении времени, затрачиваемого на электрофоретический анализ, учитывалось время, необходимое для графической обработки результатов.

В работе (Foo et al., 1981) проводили сравнение нескольких методов, рекомендуемых Ассоциацией клинической биохимии, с помощью которых можно выявлять различия между сыворотками больных с заболеваниями сердца и печени. Сравнивали следующие методики: иммунохимическое определение (тест Isomune LD), электрофорез, определение α-гидроксибутиратдегидрогеназы, определение ЛДГ, устойчивой к действию мочевины, или термостабильной ЛДГ. Наиболее достоверные результаты удавалось получать при определении ЛДГ-1 с помощью иммунопреципитации. Этому методу несколько уступали методы, основанные на определении термостабильной ЛДГ и на электрофоретическом определении ЛДГ-1. Фиксация α-оксибутиратдегидрогеназной активности или ЛДГ, устойчивой к мочевине, не давала статистически заметного выигрыша по сравнению с определением общего уровня ЛДГ.

Поскольку в миокарде содержание изофермента ЛДГ-1 выше, чем ЛДГ-2, чувствительный анализ, регистрирующий повышение концентрации ЛДГ-1 в сыворотке, должен фиксировать возникновение некроза миокарда прежде, чем содержание ЛДГ-1 в периферической крови станет выше, чем содержание ЛДГ-2. Как показано в работе (Usategui-Gomez et al., 1979), для 20—25% больных с помощью теста, основанного на количественном определении уровня ЛДГ-1, можно раньше диагностировать некроз, чем методом, в котором в качестве критерия рассматривается отношение ЛДГ-1/ЛДГ-2, устанавливаемое по данным электрофореза.

В заключение отметим, что метод определения изоферментов ЛДГ, несмотря на его продемонстрированную эффективность, не нашел еще достаточно широкого применения в диагностике острого инфаркта миокарда. Отчасти это, по-видимому, объяс-

няется ограничениями, которые характерны для электрофоретических методов анализа — трудоемких и отнимающих значительное время, а также недостаточной специфичностью методов анализа, обусловленной различиями в физико-химических свойствах изоферментов. В то же время иммунохимическое определение ЛДГ-1 быстро внедряется в практику клинических лабораторий в качестве наиболее эффективного диагностического метода. Этот метод сочетает в себе такие преимущества, как простота, высокая чувствительность и специфичность. Для его осуществления не требуются ни дополнительные наборы реактивов, ни специальное оборудование. Метод может быть очень легко введен в повседневную практику клинических лабораторий, занимающихся определением ЛДГ.

Свойства креатинкиназы

Определение изофермента КК-МВ креатинкиназы (АТР: креатин-N-фосфотрансферазы, КФ 2.7.3.2) принято считать наиболее чувствительным способом выявления поражений миокарда (Galen, 1975, 1978; Lott, Stang, 1980). В силу того что обнаружение этого фермента очень важно для клиники, было разработано множество методик его определения. Тщательно изучали иммунохимические свойства изоферментов креатинкиназы и возможности создания на их основе диагностических методов определения содержания КК-МВ, отличающихся высокой специфичностью, которая характерна для процессов взаимодействия антиген — антитело.

В 1964 г. с помощью электрофоретического анализа было выявлено существование трех изоферментов КК, отличающихся по электрофоретической подвижности в агаровом геле (Burgher et al., 1964). Было показано, что эти изоферменты представляют собой димеры, построенные из субъединиц двух типов. Субъединичное строение трех изоформ отражается формулами: ММ (М — от англ. «muscle», т. е. субъединицы, преимущественно синтезируемые в мышечных тканях), ВВ (В — от англ. «brain», т. е. субъединицы, преимущественно синтезируемые в клетках мозга) и МВ (смешанный тип). Эти изоформы обозначают также КК-1 (ВВ), КК-2 (МВ) и КК-3 (ММ) в соответствии с их электрофоретическим распределением в геле: быстрее других изоформ к аноду мигрирует КК-ВВ, медленнее других — КК-ММ, гибридный изофермент КК-МВ характеризуется промежуточной подвижностью. Существование трех различных изоформ КК побудило исследователей выделить их в чистом виде, а также получить и охарактеризовать антисыворотки для каждого из трех очищенных изоферментов (Neumeier et al., 1976; Jockers-Wretou et al., 1975; Zweig et al., 1978; Morin et al., 1974; Keutel et al., 1972; Roberts et al., 1977). Вскоре стало ясно, что два типа субъединиц КК иммунологически отличаются друг от друга. Антисыворотки, полученные против изофермента КК-ММ, не реагируют с КК-ВВ, и наоборот. Как и следовало ожидать, гибридный изофермент КК-МВ реагирует как с антителами против КК-ВВ, так и с антителами против КК-ММ. Эти наблюдения позволили нам разработать быстрый и специфичный метод иммунохимического определения уровня КК-МВ в сыворотке человека.

Разработка простого и быстрого иммунохимического метода определения изофермента КК-МВ (тест Isomune[R] CK)

В данном иммунохимическом методе определения КК-МВ используются как ингибирующие, так и преципитирующие свойства козьей антисыворотки против изофермента КК-ММ (Wicks et al., 1982). В ходе анализа к образцу тестируемой сыворотки добавляют избыток антител, специфичных к М-субъединицам. В результате полностью подавляется ферментативная активность М-субъединиц в составе КК-ММ и КК-МВ. В другой пробирке с использованием тех же антител достигают преципитации изоформ КК-ММ и КК-МВ, содержащихся в образце. Разница в остаточной активности между этими двумя пробирками является количественной мерой активности В-субъединицы, входящей в состав гибридного изофермента КК-МВ. Ниже приведено подробное описание данной методики.

Приготовление реагентов. Чистый изофермент КК-ММ выделяли из скелетной мышцы человека, как описано в работе (Usategui-Gomez et al., 1981). Для получения козьих антител проводили еженедельные подкожные инъекции препаратами, содержащими по 2 мг очищенной КК-ММ, эмульгированной в полном адъюванте Фрейнда. Перед использованием в анализе определяли титр антител по взаимодействию с очищенным препаратом КК-ММ, разведенным сывороткой человека (рис. 21-7).

После инкубации в течение 10—20 мин при комнатной температуре регистрировали практически полное ингибирование активности М-субъединицы. Между препаратами козьей антисыворотки, полученными от разных иммунизированных особей, наблюдались заметные различия в титре и ингибирующих свойствах. В среднем для одного препарата из пяти титр и ингибирующее действие оказывались на достаточно высоком уровне, необходимом для его эффективного применения в условиях данного анализа.

Ослиные антитела против козьих IgG получали, вводя по 2,5 мг препарата очищенных козьих IgG подкожно один раз в неделю. Полученную антисыворотку подвергали фракционному осаждению сульфатом аммония с последующей гидрофобной адсорбцией фракции антител на поливинилиденфторидных гра-

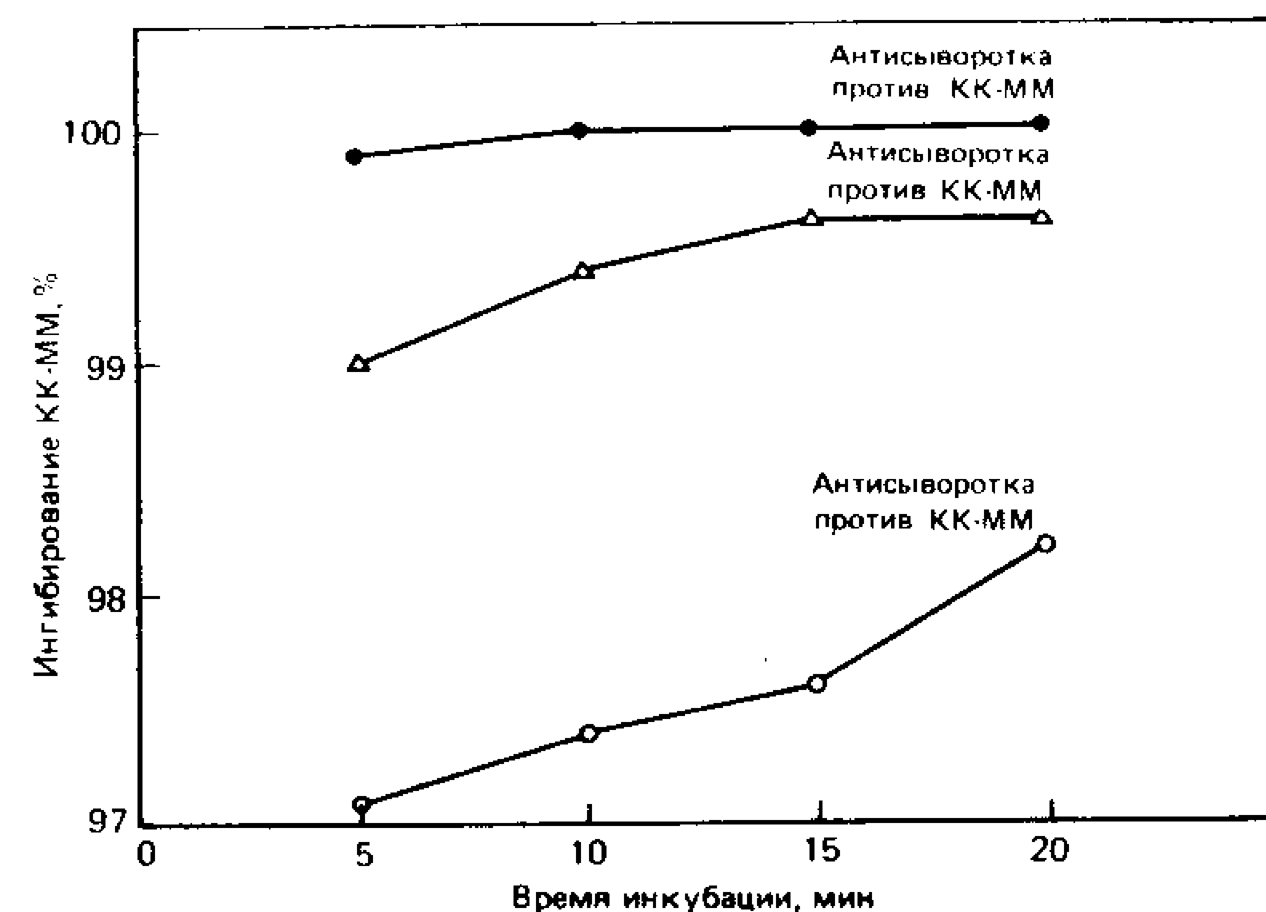


Рис. 21-7. Кинетика иммуноингибирования. Для проверки эффективности применения различных разведений антисыворотки против КК-ММ (верхняя кривая 1 : 50, средняя 1 : 150, нижняя 1 : 250) в иммунохимическом тестировании КК-МВ использовали контрольную сыворотку, содержащую известное количество очищенного изофермента КК-ММ человека. Для изучения кинетики реакции варьировали также время инкубации в пробирке 1, где осуществлялось иммуноингибирование.

нулах (Newman et al., 1980). Сорбционная активность такого конъюгата [полимер—антитело] по связыванию козьих IgG достигала 400 мкг на 1 мл его 20%-ной водной суспензии. Такую суспензию твердого носителя с иммобилизованными антителами, обладающую высокой сорбционной емкостью, использовали для количественного связывания большого избытка антител против КК-ММ, необходимого для осуществления стадии иммунопреципитации.

Козьи антитела против КК-ММ титровали также по их способности к преципитации антигенов. Контрольный препарат сыворотки человека, содержащий 80% очищенного изофермента КК-ММ и 20% очищенного КК-МВ (общая ферментативная активность 1300 МЕ/л при 37 °С), инкубировали 5 мин при комнатной температуре с различными разведениями антисыворотки. Далее добавляли избыток иммобилизованных вторых антител и инкубировали еще 5 мин. После центрифугирования полноту удаления КК-ММ и КК-МВ из супернатанта проверяли с помощью электрофореза, предварительно сконцентрировав образец ~ в 5 раз. Для эффективного ингибирования и преципитации, как правило, требовалось разведение антисыворотки в 50—200 раз.

Иммунохимический метод определения КК-МВ. Аликвоту антисыворотки против КК-ММ (250 мкл) в соответствующем разведении добавляли к 200 мкл тестируемой сыворотки и инкубировали не менее 20 мин при комнатной температуре. Параллельно в другой пробирке 200 мкл тестируемой сыворотки инкубировали с 50 мкл той же антисыворотки в течение 5 мин

при комнатной температуре, после чего добавляли 200 мкл суспензии иммобилизованных на носителе антител против козьих IgG и инкубировали еще 5 мин. Связавшиеся с твердой фазой КК-ММ и КК-МВ удаляли центрифугированием при 1000 g в течение 5 мин. Измеряли и сравнивали остаточные активности в первой и второй (контрольной) пробирках, используя подходящий субстрат креатинкиназы. В первой пробирке проявление остаточной, не ингибируемой антителами активности может быть обусловлено следующими факторами: активностью В-субъединиц изоформы КК-МВ и В-субъединиц изоформы КК-ВВ или каких-либо иных аномальных изоформ, а также активностью митохондриальной КК и аденилаткиназы. Остаточная активность в супернатанте из контрольной пробирки объясняется теми же факторами, за исключением активности изофермента КК-МВ, который удаляется из раствора при иммунопреципитации. Удвоенная разность полученных таким образом значений остаточной активности дает искомое значение активности КК-МВ в тестируемой сыворотке.

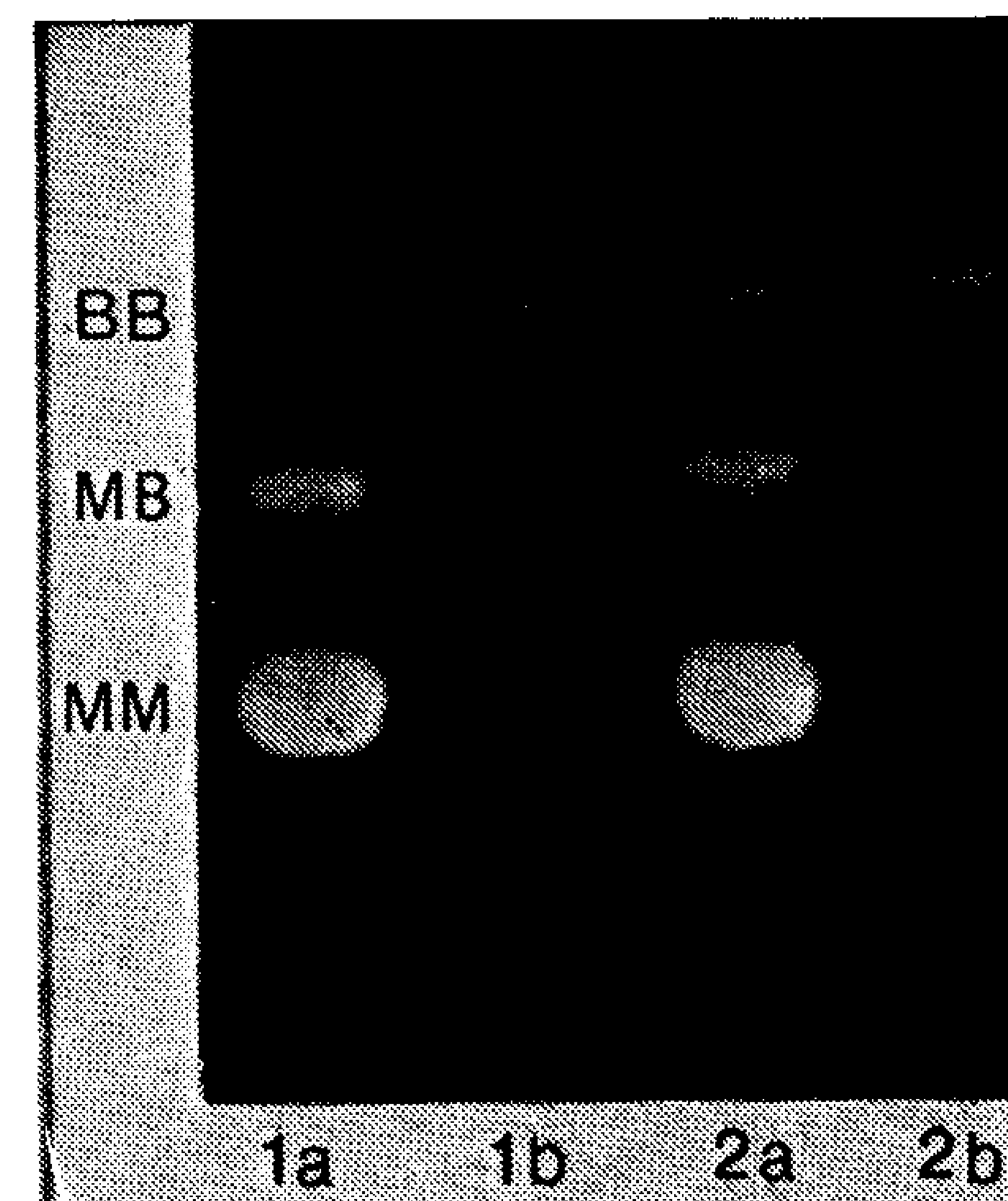


Рис. 21-8. Влияние присутствия КК-ВВ на иммунохимическое определение КК-МВ. Проведен иммунохимический анализ 8 образцов, содержащих КК-МВ, до и после добавления к ним КК-ВВ (30 МЕ/л). На электрофореграмме представлены образцы 1 и 2 (из табл. 21-2) до и после преципитации антисывороткой против КК-ММ и суспензией иммобилизованных вторых антител.

Характеристики иммунохимического метода определения КК-МВ. Для изучения возможного влияния КК-ВВ на результаты иммунохимического тестирования КК-МВ сравнивали данные анализа одного и того же КК-МВ-содержащего образца сыворотки до и после добавления к нему определенного количества очищенной КК-ВВ. Оказалось, что в пределах ошибки анализа, присутствие КК-ВВ не влияет на результаты определения КК-МВ (рис. 21-8 и табл. 21-2). Точность анализа при активности 100 МЕ/л и 11,2 МЕ/л достигает соответственно 1,3% и 2,4% в рамках одного опыта и значений 4,5% и 6,3% при сравнении внутри серии опытов. При этом наблюдалась идеальная линейная регрессионная зависимость для серии разведений положительного контроля в солевом растворе, отвеча-

Таблица 21-2. Влияние КК-ВВ на иммунохимическое тестирование КК-МВ

Образец	Активность КК-МВ, МЕ/л	
	до добавления КК-ВВ	после добавления КК-ВВ
1	108,0	104,8
2	77,0	78,8
3	63,2	66,0
4	42,0	40,0
5	45,6	47,8
6	49,0	48,8
7	63,2	65,6
8	113,4	100,2

ющая уравнению $y=1{,}002\,x - 0{,}6$ (x — теоретическое значение для КК-МВ, y — реальное значение для КК-МВ).

Наши собственные клинические исследования показали, что данный иммунохимический вариант анализа так же эффективен в диагностике, как и электрофоретический метод определения КК-МВ. При анализе сывороток, полученных от 40 человек, у которых по клиническим и биохимическим данным не было инфаркта, значения активности КК-МВ соответствовали норме. Среднее значение в этой серии было равно 2,4 МЕ/л при стандартном отклонении (S) 2,1 МЕ/л. В качестве порогового уровня диагностической чувствительности принимали значение активности 8,7 МЕ/л (т. е. среднее значение $+3S$).

Используя данное пороговое значение, у 43 больных с подтвержденным инфарктом миокарда было показано достоверное превышение уровня КК-МВ по крайней мере в одном из серийных образцов. В рамках этого исследования данные электрофореза в агарозном геле также характеризовались 100%-ной диагностической эффективностью. При тестировании 40 больных, не имевших инфаркта, специфичность иммунохимического анализа достигала 95%. Для одного из больных с диагнозом ишемия миокарда было установлено предельное значение активности КК-МВ — 10,6 МЕ/л и наличие соответствующей белковой полосы при электрофорезе. Для другого больного также обнаруживалось присутствие следовых количеств КК-МВ на электрофореграмме при установленной иммунохимическим методом активности 9,8 МЕ/л. Таким образом, проведенные широкие клинические испытания (Ali et al., 1982; Bruns et al., 1983; Seckinger et al., 1983) подтверждают высокую диагностическую эффективность иммунохимического метода анализа.

Аномальные изоферменты. В ходе клинических испытаний иммунохимического метода определения КК-МВ в образцах сыворотки двух больных мы обнаружили изоферменты КК с

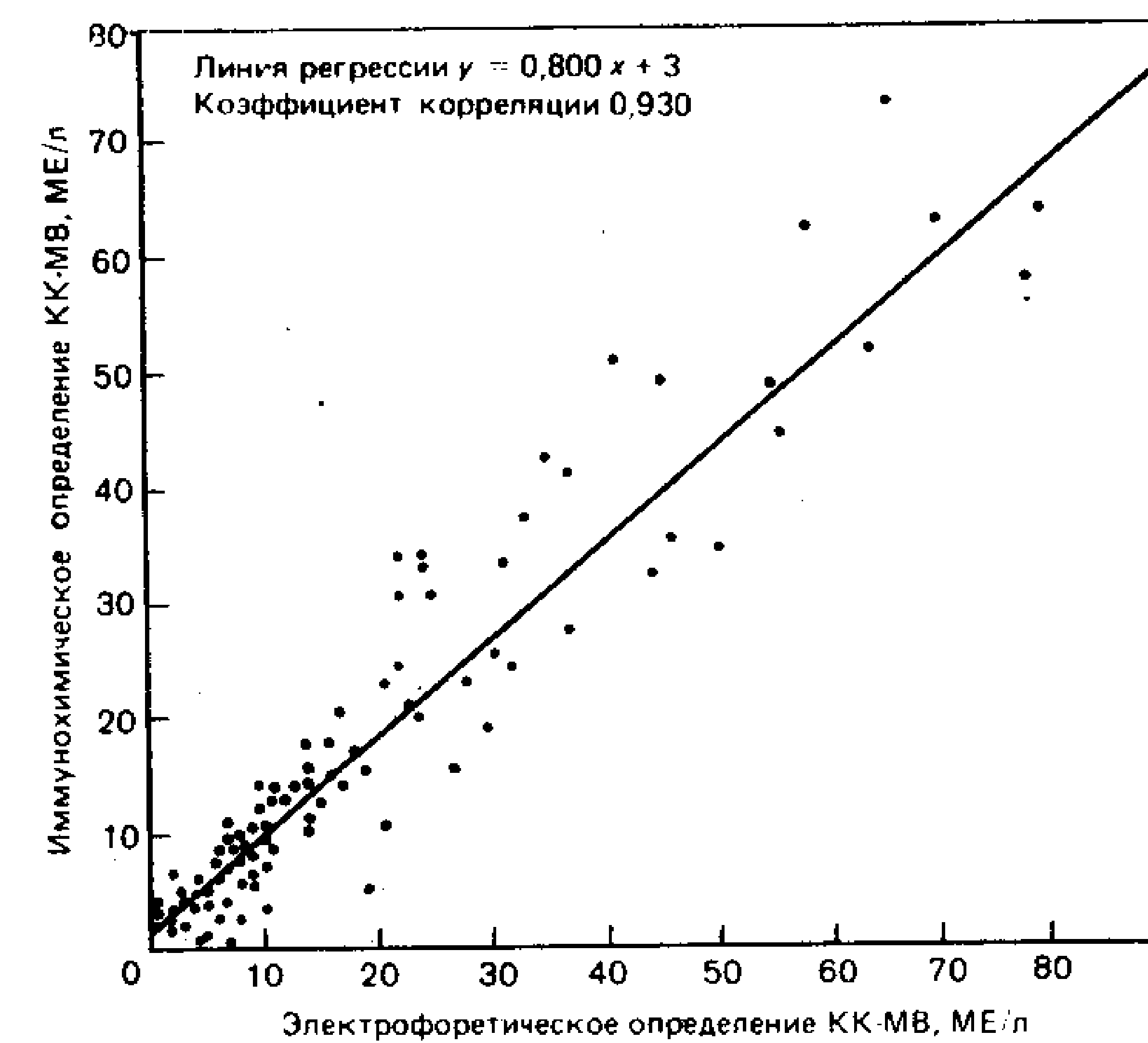


Рис. 21-9. Корреляция данных иммунохимического и электрофоретического определения КК-МВ в образцах, содержащих этот изофермент. Количественную оценку электрофоретических данных проводили с помощью денситометрического сканирования.

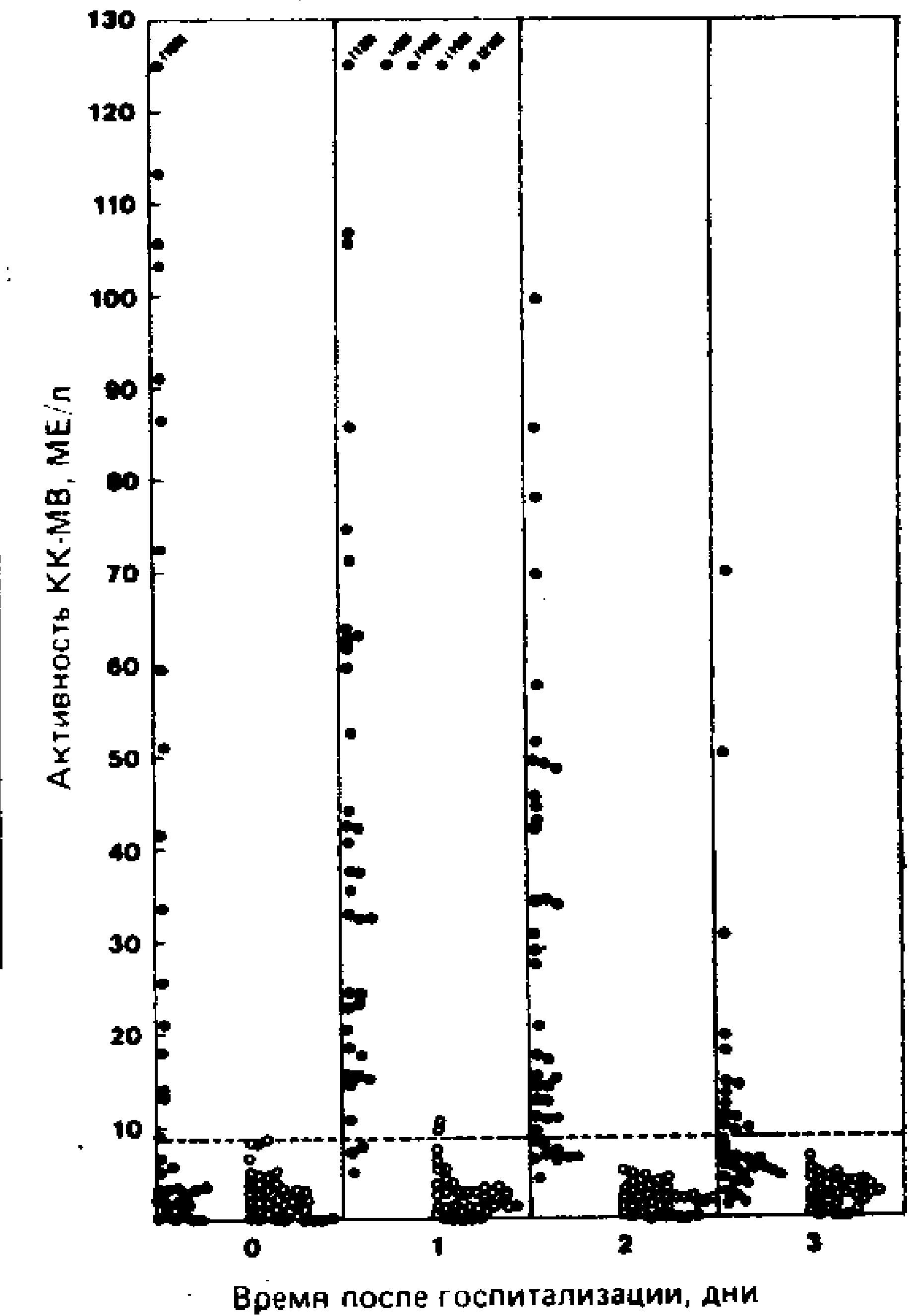


Рис. 21-10. Изменение содержания КК-МВ во времени по данным иммунохимического анализа. *Темные кружки* — больные с установленным инфарктом миокарда; *светлые кружки* — больные с иным диагнозом. Прерывистой линией отмечен установленный «пороговый» уровень активности КК-МВ (8,7 МЕ/л).

аномальной электрофоретической подвижностью. В процессе электрофореза соответствующие им полосы мигрировали между полосами КК-ММ и КК-МВ. При иммунохимическом тестировании в этих образцах была обнаружена повышенная остаточная активность в обеих пробирках. Однако при обычном расчете удвоенная разность значений активности в двух пробирках, т. е. активность КК-МВ в этих образцах, оказалась ниже установленного порогового значения. Это свидетельствует о сохранении специфичности метода при анализе образцов, содержащих аномальные изоформы КК (рис. 21-11—21-13). Данные других авторов также подтверждают вывод о том, что специфичность анализа распространяется и на образцы, содержащие КК-ВВ и аномальные изоферменты (Seckinger, 1983; Pesce, 1983). Мы обследовали множество клинических образцов с целью обнаружения аномальных изоферментов КК и изучали их взаимодействия с антителами против КК-ММ и КК-ВВ. В соответствии с большинством опубликованных данных нам

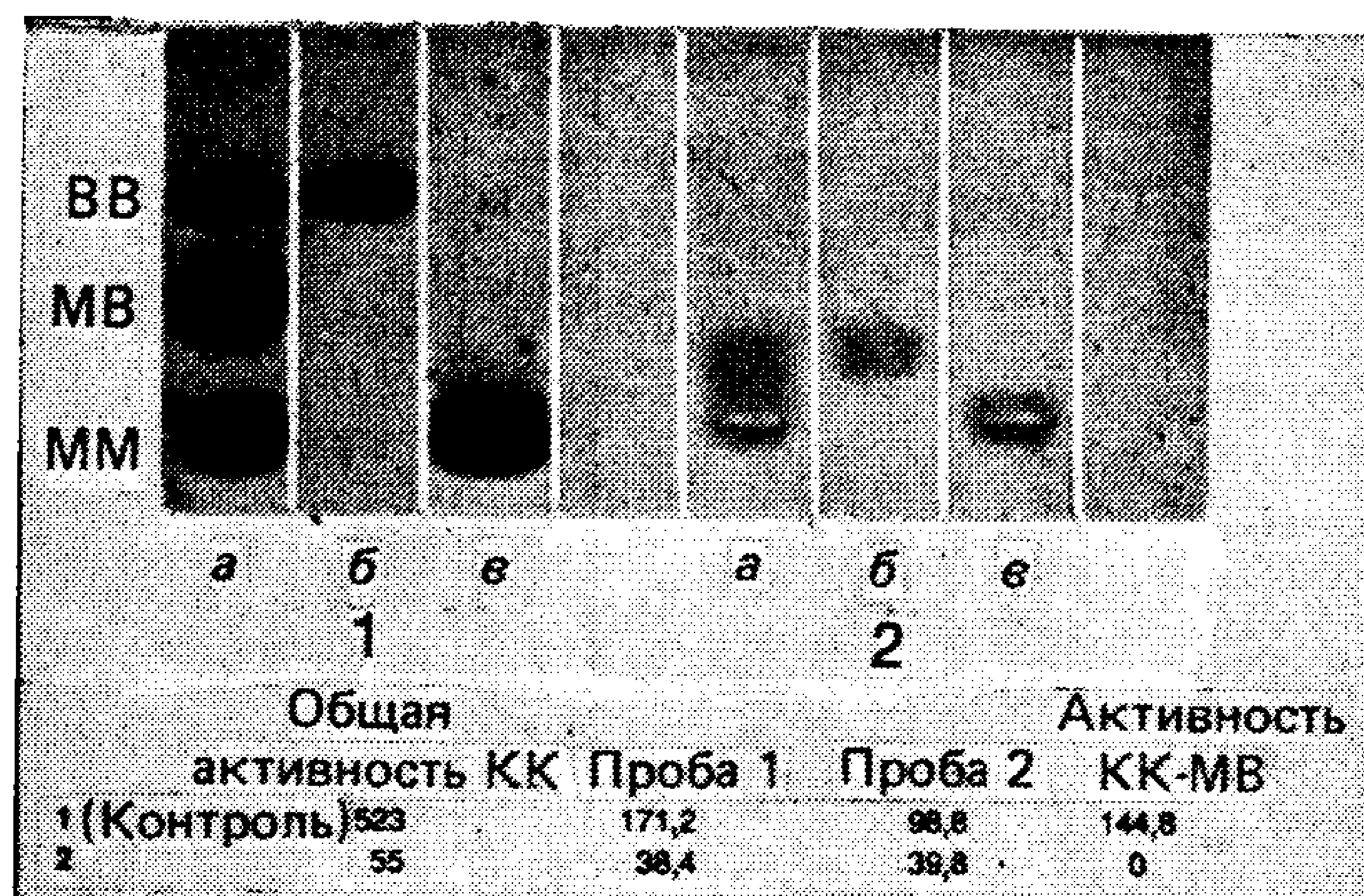


Рис. 21-11. Обнаружение аномальных изоферментов креатинкиназы при иммунохимическом тестировании КК-МВ. *а* — препарат после обработки буфером; *б* — препарат после обработки антителами против КК-ММ и суспензией иммобилизованных вторых антител; *в* — препарат после обработки антителами против КК-ВВ и суспензией иммобилизованных вторых антител.

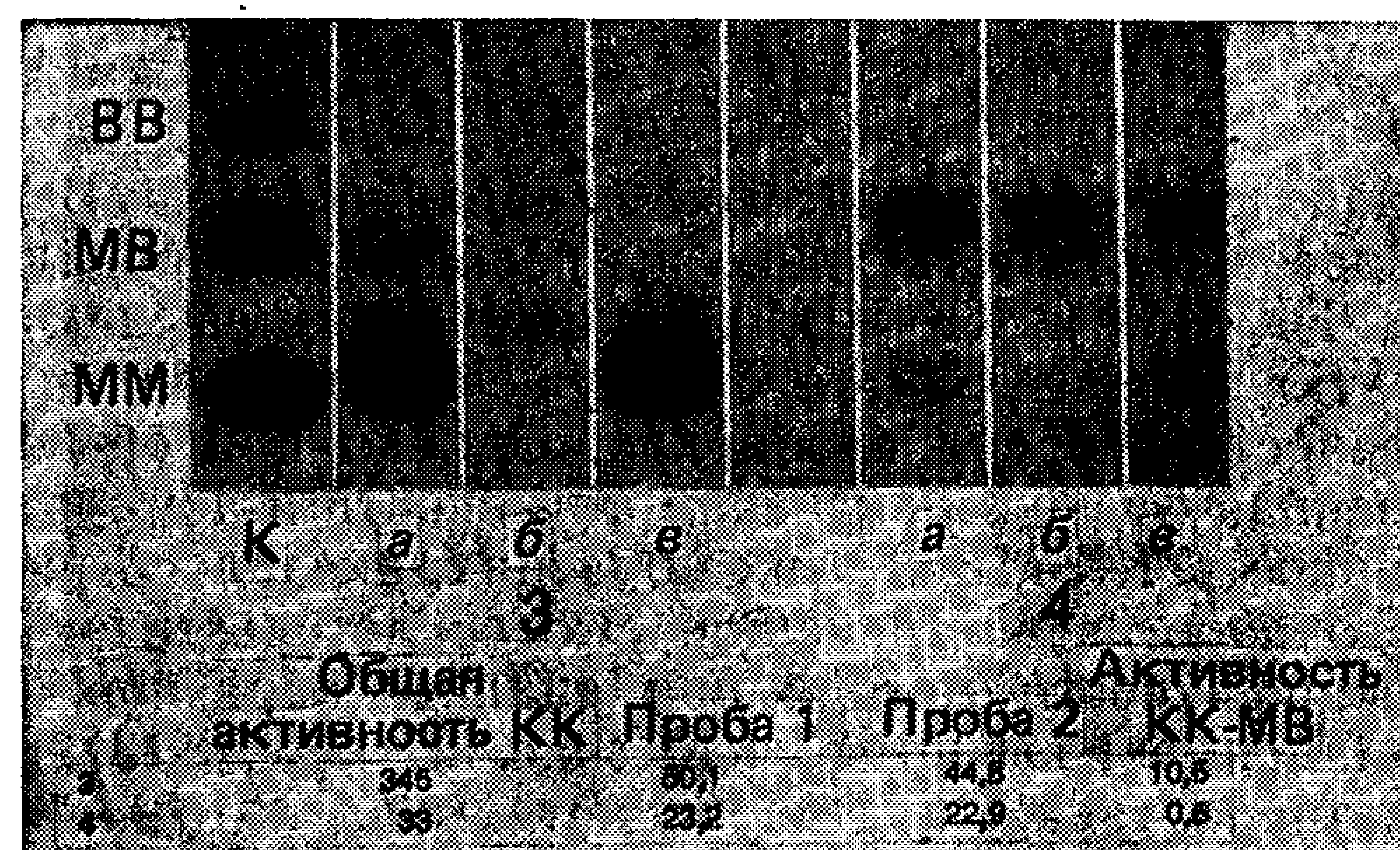


Рис. 21-12. Обнаружение аномальных изоферментов креатинкиназы при иммунохимическом тестировании КК-МВ. *а* — препарат после обработки буфером; *б* — препарат после обработки антителами против КК-ММ и суспензией иммобилизованных вторых антител; *в* — препарат после обработки антителами против КК-ВВ и суспензией иммобилизованных вторых антител.

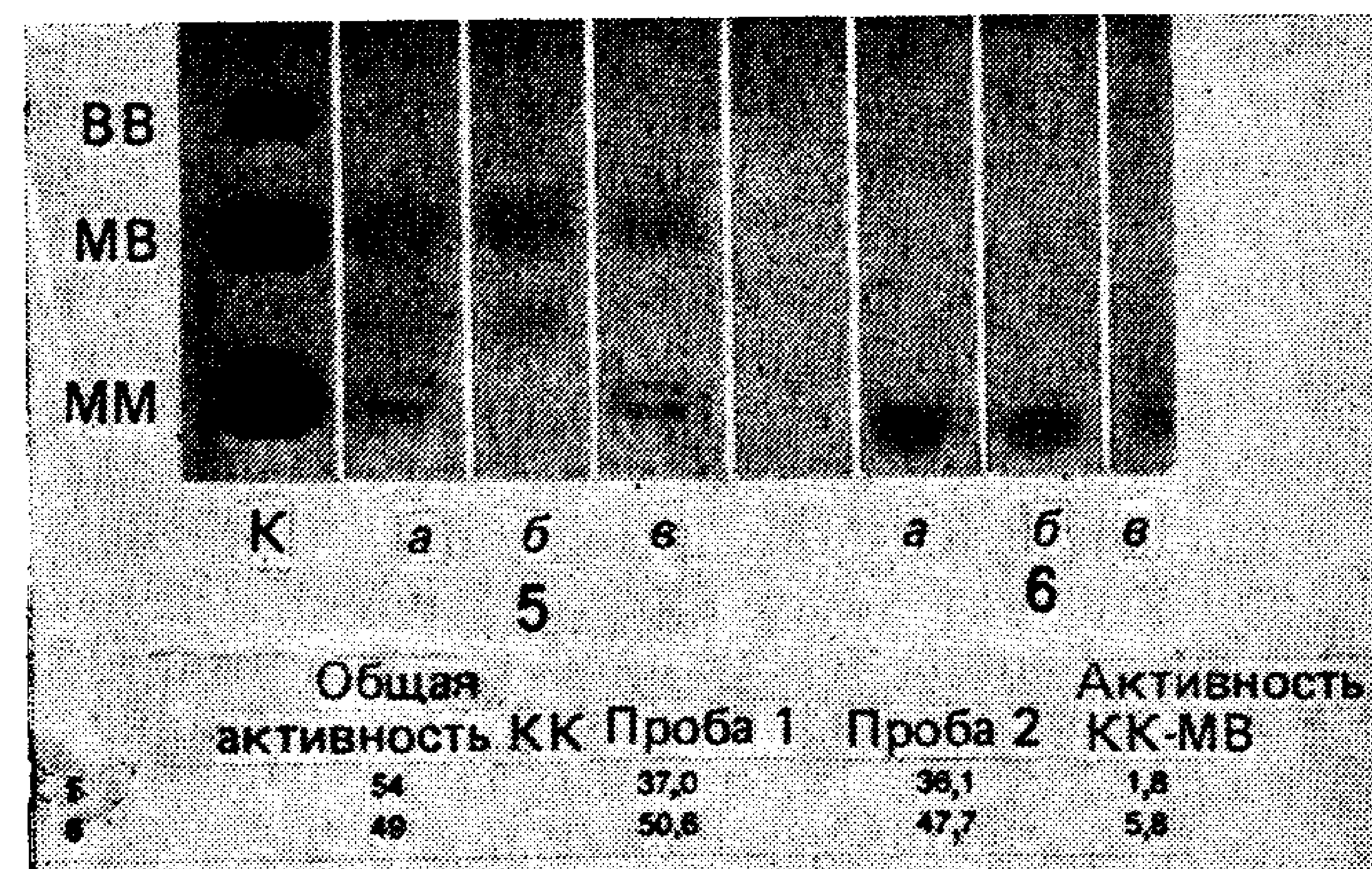


Рис. 21-13. Обнаружение аномальных изоферментов креатинкиназы при иммунохимическом тестировании КК-МВ. *а* — препарат после обработки буфером; *б* — препарат после обработки антителами против КК-ММ и суспензией иммобилизованных вторых антител; *в* — препарат после обработки антителами против КК-ВВ и суспензией иммобилизованных вторых антител.

удалось выявить существование двух основных типов аномальных изоформ КК.

Чаще всего обнаруживается изофермент, мигрирующий при электрофорезе между КК-ММ и КК-МВ. Было показано, что этот изофермент (изофермент типа I) в действительности представляет собой комплекс КК-ВВ с сывороточным IgG. Это подтвердили с помощью ряда экспериментальных приемов. Характер элюции данного изофермента при гель-фильтрации соответствует мол. массе 325 000. Преципитация изофермента наблюдается как при действии антисыворотки против КК-ВВ, так и в присутствии А-белка. Кроме того, после инкубации при высокой концентрации мочевины наблюдается разрушение комплекса, сопровождающееся появлением при электрофорезе полосы с обычной подвижностью КК-ВВ. Наконец, при добавлении очищенной КК-ВВ к образцу сыворотки, содержащему аномальную КК типа I, наблюдается превращение добавленной КК-ВВ в аномальную форму, мигрирующую между КК-ММ и КК-МВ. Присутствие аномального изофермента типа I наиболее характерно для пожилых женщин. Как правило, он обнаруживается в сыворотке в течение нескольких месяцев или даже лет, но пока никакой корреляции между его присутствием и какими-либо клиническими проявлениями не установлено.

Аномальная форма КК другого типа, которую обычно относят к типу II, при электрофорезе располагается ближе к катоду, чем КК-ММ. По-видимому, она представляет собой КК митохондрий. Авторами ряда работ показано, что митохондри-

альная форма КК не реагирует с антисыворотками против КК-ВВ и КК-ММ (Bohner et al., 1982; Roberts Graue, 1980). При анализе ограниченного набора образцов, содержащих аномальную КК типа II, нам удалось это подтвердить. Имеются также данные, которые позволяют предположить существование двух взаимопревращающихся форм митохондриальной КК (Hall et al., 1979; Wevers et al., 1980), одна из которых при электрофорезе мигрирует ближе к катоду, а другая — по подвижности совпадает с КК-ММ. В сыворотке митохондриальная форма КК присутствует часто вместе с КК-ВВ. В ряде работ сообщается о корреляции между присутствием этой аномальной изоформы и запущенной стадией ракового заболевания (Kwong, Awan, 1981; James et al., 1979; Heinz et al., 1986; Stein et al., 1982; Bark, 1980; Pesce, 1982; Bayer et al., 1982).

Помимо вышеупомянутых «классических» вариантов аномальной креатинкиназы мы зарегистрировали у двух больных аномальный изофермент, который мигрирует при электрофорезе вместе с КК-МВ (рис. 21-12 и 21-13), но не реагирует с антисыворотками против КК-ММ или КК-ВВ. Происхождение и строение этого аномального изофермента еще не установлено.

Клинические испытания теста Isomune CK^R

Кроме наших собственных клинических испытаний этого иммунохимического теста (Wicks et al., 1982) подобные испытания были проведены и в ряде других лабораторий. В работе (Ali et al., 1982) были обследованы 215 больных, поступивших в отделение сердечно-сосудистой интенсивной терапии с предположительным диагнозом острый инфаркт миокарда. Каждый из этих пациентов ежедневно проходил обследование, включающее снятие электрокардиограммы, определение общей лактатдегидрогеназной активности и активности ЛДГ-1 (тест Isomune^R LD), а также определение общей креатинкиназной активности и относительного содержания отдельных изоферментов креатинкиназы как методом Isomune^R CK, так и с помощью электрофореза на ацетатцеллюлозных пленках. Диагноз «острый инфаркт миокарда» ставили по совокупности клинических наблюдений, активности ЛДГ-1 и данных электрокардиограммы. В некоторых случаях при постановке диагноза учитывали также даные технеций-пирофосфатного сканирования или аутопсии. На основании названных критериев был поставлен диагноз острый инфаркт 45 больным.

В результате анализа 100 образцов, полученных от пациентов, не имеющих острого инфаркта миокарда, для иммунохимического метода определения КК-МВ было выбрано нижнее «пороговое» значение активности КК-МВ 10 МЕ/л (среднее значение+3S). В случае электрофоретического тестирования

положительными считались образцы, для которых визуально и денситометрически удавалось зарегистрировать наличие соответствующей белковой полосы. В любом из методов больному ставили диагноз «инфаркт», если в полученной от него серии образцов один или более оказывались положительными. На основании названных критериев методом Isomune^R CK был правильно поставлен диагноз для 43 из 45 больных с установленным инфарктом (96%) и для 162 из 170 человек с отрицательным диагнозом (95%). Диагностическая эффективность данного метода достигает, таким образом, 95%. Для электрофоретического метода аналогичные характеристики имели значения 42 из 45 (93%) и 161 из 170, что соответствует общей диагностической эффективности 94%. Эти цифры хорошо согласуются с нашими наблюдениями — при обследовании 83 больных было показано, что иммунохимический метод обладает 100%-ной чувствительностью и 95%-ной специфичностью.

В работе Бранса и др. (Bruns et al., 1983) эффективность метода Isomune^R CK оценивали по результатам тестирования 99 больных, поступивших в сердечно-сосудистое отделение клиники, и сравнивали их с данными электрофореза в агарозном геле. Образцы сыворотки получали при госпитализации и в последующие 24 ч с интервалами от 4 до 8 ч, а также с интервалами от 8 до 24 ч в течение 4 сут после госпитализации. При постановке диагноза учитывались клинические показатели, изменение электрокардиограммы и данные определения в сериях образцов общего уровня креатинкиназной активности, содержания изоферментов креатинкиназы (с помощью электрофореза) и изоферментов лактатдегидрогеназы. Общий уровень активности креатинкиназы и активности изофермента КК-МВ измеряли методом Isomune при 30 °С.

Для 27 больных с подтвержденным инфарктом миокарда и иммунохимическим, и электрофоретическим методом удавалось обнаружить по крайней мере один положительный образец на серию, что соответствует 100%-ной чувствительности. При обследовании 72 человек с отрицательным диагнозом специфичность иммунохимического метода достигала 97%, а электрофоретического — 94%. Оба метода позволяли обнаружить инфаркт приблизительно в одно и то же время. В случае электрофоретического анализа первые положительные результаты регистрировали через 5,8±4,4 ч после поступления, а в случае иммунохимического тестирования — через 5,3±4,6 ч.

В трех случаях количественное иммунохимическое определение КК-МВ позволило установить возникновение повторного инфаркта уже в клинике. Предположение о повторном инфаркте для этих больных было сделано на основании изменений в электрокардиограмме, последовавших за новым приступом грудной боли. Ни определение общей креатинкиназной актив-

ности, ни электрофоретический метод не позволили сделать выводы о повторном инфаркте. В то же время данные иммунохимического анализа свидетельствовали о появлении второго пика на кривой изменения активности КК-МВ. Преимущества иммунохимического метода часто могут оказаться весьма полезными для решения такого рода задач, встречающихся в клинической практике (Marmor et al., 1981).

В работе (Wu, Bowers, 1982) сравнивали эффективности метода Isomune CK и метода иммуноингибирования, используя для выявления аномальных форм креатинкиназы электрофоретический анализ. При обследовании 53 здоровых взрослых были установлены относительные пороговые значения активности КК-МВ при 29,8 °С — 8 МЕ/л (для метода иммуноингибирования) и 5 МЕ/л (для метода Isomune-CK). Во всех образцах сыворотки, полученных от 55 больных из отделения острых сердечных заболеваний (с положительным диагнозом, поставленным на основании данных иммуноингибирования), уровень активности КК-МВ, определенный методом Isomune CK, превышал пороговый уровень 5 МЕ/л ($y=0{,}5x+1{,}5$, где y — активность по данным метода Isomune CK, x — активность по данным иммуноингибирования). Однако при обследовании 34 больных, в сыворотке которых с помощью электрофореза были обнаружены аномальные изоферменты (типа I и II или КК-ВВ), уровень корреляции между двумя методами оказался крайне низким. Так, по данным иммуноингибироввания все образцы в рамках данной группы классифицировались как положительные. В то же время при использовании метода Isomune CK не было зарегистрировано ни одного ошибочного положительного ответа, что еще раз подтверждает высокую избирательность этого метода.

Клинические испытания метода Isomune CK были проведены также в работе (Seckinger et al., 1983). Авторы сравнивали полученные результаты с данными методов, основанных на иммуноингибировании (A-gent CK-MB, фирма Abbot), радиометрическом определении КК-МВ (Embria CK, фирма International Immunoassay Labs, Inc.) и электрофорезе в агарозном геле (фирма Corning Medical and Scientific). Для каждого из методов пороговый уровень ответа определяли по результатам анализа препаратов, полученных от 40 здоровых людей. При обследовании больных, поступивших в сердечно-сосудистое отделение клиники с подозрением на инфаркт миокарда, уровень КК-МВ определяли в пробах, взятых в момент госпитализации и спустя 8 и 24 ч после госпитализации. Для оценки специфичности методов в это исследование были включены также 15 образцов, содержащих изоформы креатинкиназы с аномальной электрофоретической подвижностью. При окончательной постановке диагноза учитывали обычные клинические факторы. Были по-

лучены следующие результаты:

	Иммуноингибирование	Иммунохимический анализ	РИА	Электрофорез
Чувствительность	18/18=100%	36/36=100%	5/5=100%	15/17=88%
Специфичность	24/40=60%	138/148=93%	12/17=71%	32/36=89%
Эффективность, %	72	95	60	89

В данном исследовании чувствительность иммунологических методов составляла 100%. При использовании электрофоретического метода определения КК-МВ не был получен положительный ответ для двух больных с установленным инфарктом миокарда. Вероятно, это связано с недостаточно высокой чувствительностью при регистрации «следовых» полос КК-МВ. Специфичность для четырех сравниваемых методов варьировала в более широких пределах. Для метода иммуноингибирования часто регистрировали ошибочные положительные ответы преимущественно из-за наличия в данном исследовании образцов, содержащих аномальные изоформы креатинкиназы. Теоретически на результатах радиоиммунологического анализа КК-МВ не должно сказываться присутствие аномальных изоферментов. Относительно высокая частота появления ошибочных положительных результатов, вероятно, объясняется недостаточно высокой точностью РИА в обычном диапазоне концентраций антигена. Из сравнения четырех методов анализа видно, что наиболее высокая эффективность характерна для иммунохимического метода.

Заключение

После того, как было выяснено большое значение для клиники определения МВ-изофермента креатинкиназы, стали детально исследовать иммунохимические особенности изоферментов креатинкиназы. В результате этих исследований был разработан целый ряд методов определения КК-МВ, в том числе РИА, иммуноингибирование, сэндвич-иммуноанализ и высокоспецифичный иммунохимический метод (Isomune CK). Из-за особенностей строения изофермента КК-МВ, состоящего из субъединиц двух типов, его избирательное определение достигается только при использовании сэндвич-иммуноанализа с применением антител против КК-ВВ и КК-ММ, а также иммунохимического анализа, основанного на сочетании иммуноингибирования и иммунопреципитации. Ввиду того что различные аномальные изоферменты креатинкиназы распространены достаточно широко, подобная избирательность представляется весьма важной характеристикой метода определения КК-МВ.

Простота, специфичность и высокая диагностическая эффективность рассмотренных иммунохимических методов определе-

ния изоферментов ЛДГ-1 и КК-МВ способствуют тому, что именно им отдают предпочтение в анализе изоферментов сердечных тканей.

Литература

Ali M., Braun E. V., Laraia S., Olisegun F., Nalebuff D., Palladino P. H. (1981). Immunochemical assay for myocardial infarction, Amer. J. Clin. Path., **76**, 426—429.

Ali M., Laraia S., Angeli R., et al. (1982). Immunochemical CK—MB assay for myocardial infarction, Amer. J. Clin. Pathol., **77**, 573—579.

Bark C. J. (1980). Mitochondrial creatine kinase, J. Amer. Med. Assoc., **243**, 2058—2060.

Bayer P. M., Wider G., Unger W. et al. (1982). Atypische kreatinkinase isoenzyme, Klin. Wochenschr., **60**, 365—369.

Bohner J., Stein W., Steinhart R. et al. (1982). Macrocreatine kinases: Results of isoenzyme electrophoresis and differentiation of the immunoglobulin-bound type by radio assay, Clin. Chem., **28**, 618—623.

Boll M., Backs M., Pfleiderer G. (1974). Quantitative Immunologische bestimming von multipler formen der lactatdehydrogenase in tierischem um humanen gewebe, Z. Physiol. Chem., **355**, 811—818.

Bruns D. E., Emerson J. C., Intemann S., Bertholf R., Hill K. E., Savory J. (1981). Lactate dehydrogenase isoenzyme-1: Changes during the first day after acute myocardial infarction, Clin. Chem., **27**, 1821—1823.

Bruns D., Chitwood J., Koller K. et al. (1983). Creatine kinase MB activity: Clinical and laboratory studies of specific immunochemical technique with optimized enzymatic assay, Ann. Lab. Clin. Sci., **13**, 59—66.

Burd J. F., Usategui-Gomez M., Fernandez De Castro A., Mhatre N. S., Yeager F. M. (1973a). Immunochemical studies on lactate dehydrogenase: Preparation and characterization of anti-M lactate dehydrogenase antiserum: Development of an immunochemical assay for lactate dehydrogenase isoenzymes in human serum, Clin. Chim. Acta, **46**, 205—215.

Burd J. F., Usategui-Gomez M. (1973b). Immunochemical studies on lactate dehydrogenase, Biochim. Biophys. Acta, **310**, 238—247.

Burgher A., Richterich H., Aebi H. (1964). Die Heterogenitat der Kreatin Kinase, Biochim. Z., **339**, 305—314.

Cahn R. D., Kaplan N. O., Levin L., Zwilling E. (1962). Nature and development of lactic dehydrogenase, Science, **136**, 962—969.

Fogh-Andersen N., Sorensen P., Muller-Petersen J., Ring T. (1982). Lactate dehydrogenase isoenzyme I in diagnosis of myocardial infarction, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., **20**, 291—294.

Foo A. Y., Nemesanszky E., Rosalki S. B. (1981). Comparison of procedures for the measurement of the adonal isoenzymes of lactate dehydrogenase in serum, Ann. Clin. Biochem., **18**, 232—236.

Galen R. S., Gambino S. R. (1975). Isoenzymes of CPK and LDH in myocardial infarction and certain other diseases, Pathobiol. Annu., **5**, 283—315.

Galen R. S. (1978). Isoenzymes and myocardial infarction, Diagn. Med., **1**, 40—52.

Gerhardt W., Hofuendahl S., Ljungdahl L., Waldenstrom J., Tryding N., Pettersson T., Ohlsson O. (1983). Serum LD-1 activity in suspected acute myocardial infarction, Clin. Chem., **29**, 1057—1060.

Hall N., Addis P., DeLuca M. (1979). Mitochondrial creatine kinase. Physical and kinetic properties of the purified enzyme from beef heart, Biochem., **18**, 1745—1751.

Heinz J. W., O'Donnel N. J., Lott J. A. (1980). Apparent mitochondrial creatine kinase in the serum of a patient with metastatic cancer to the liver, Clin. Chem., **26**, 1908—1911.

James G. P., Harrison R. L. (1979). Creatine kinase isoenzymes of mitochondrial origin in human serum, Clin. Chem., **25**, 943—947.

Jockers-Wretou E., Pfleiderer G. (1975). Quantitation of creatine kinase isoenzymes in human tissues and sera by an immunological method, Clin. Chim. Acta, **58**, 223—232.

Jockers-Wretou E., Plessing E. (1979). Atypical serum creatine kinase isoenzyme pattern caused by complexing of creatine kinase-BB with immunoglobulins G and A, J. Clin. Clin. Biochem., **17**, 731—737.

Keutel H. J., Okabe K., Jacobs H. K., et al. (1972). Studies on adenosine triphosphate transphosphorilases XI. Isolation of the crystalline adenosine triphosphate creatine transphosphorilases from the muscle and brain of man, calf and rabbit, and a preparation of their enzymetically active hybrids, Arch. Biochem. Biophys., **150**, 648—678.

Kwong T. C., Arvan D. A. (1981). How many creatine kinase "isoenzymes" are there and what is their clinical significance? Clin. Chim. Acta, **115**, 3—8.

Liu F., Belding R., Usategui-Gomez M., Reynoso G. (1981). Immunochemical determination of LDH-1, Amer. J. Clin. Path., **75**, 701—707.

Lott J. A., Stang J. M. (1980). Serum enzymes and isoenzymes in the diagnosis and differential diagnosis of myocardial ischemia and necrosis, Clin. Chem., **26**, 1241—1250. Review.

Ljungdahl L., Gerhardt W. (1978). Creatine kinase isoenzyne variants in human serum, Clin. Chem., **24**, 832—834.

Markert C. L., Appella E. (1963). Immunochemical properties of lactate dehydrogenase isoenzymes, Ann. N. Y. Acad. Sci., **103**, 915—929.

Marmor A. Sobel B. E., Roberts R. (1981). Factors presaging early recurrent myocardial infarct ("extension"), Amer. J. Cardiol., **48**, 603—610.

McCoy M. T., Aguanno J. J., Ritzmann S. E. (1983). Lactate dehydrogenase isoenzyme I; A rapid assay for ischemic myocardial disease, Arch. Intern. Med., **143**, 434—436.

Morin L. B. (1979). Creatine kinase isoenzyme antibody reactions in immunoinhibition and immunonephelometry, Clin. Chem., **25**, 1415—1419.

Neumeier D., Prellwitz W., Wurzburg U. et al. (1976). Determination of creatine kinase isoenzyme MB activity in serum using immunological inhibition of creatine kinase M subunit activity, Clin. Chim. Acta, **73**, 445—451.

Newman E., Hager H. J., Hansen H. J. (1980). Preparation of Kynar resin particles as a dispersed solid-phase antibody. Paper given at 72nd annual meeting of the Amer. Assoc. for Cancer Research, May 1980, Details of polyvinylidene fluoride coupling can be found in U. S. Patent No. 3, **843**, 443.

Nisselbaum J. S., Bodansky O. (1963). Immunochemical studies of human lactic dehydrogenase, Ann. N. Y. Acad. Sci., **103**, 930—937.

Resce M. A. (1982). The CK isoenzymes: Findings and their meaning, Lab. Mgmt., **20**, 25—37.

Pesce M., Bodourian S. (1983). Effect of atypical creatine kinase isoenzymes and CK—BB on an immunochemical CK—MB assay, Clin. Chem., **29**, 584—585.

Roberts R., Parker C. W., Sobel B. E. (1977). Detection of acute myocardial infarction by radioimmunoassay for creatine kinase HB, Lancet, ii, 319—322.

Roberts R., Grace A. M. (1980). Purification of mitochondrial creatine kinase, J. Biol. Chem., **255**, 2280—2287.

Sax S. M., Moore J. J., Giegel J. L., Welsh M. (1979). Further observations on the incidence and nature of atypical creatine kinase activity, Clin. Chem., **25**, 535—541.

Seckinger D., Vasquez A., Rosenthal P., Mendizabal R. (1983). Cardiac isoenzyme methodology and the diagnosis of acute myocardial infarction, Amer. J. Clin. Path., **80**, 164—169.

Stein W., Bohner J., Steinhart R., Effstein M. (1982). Macro creatine kinase: Determination and differentiation of two types by their activation energies, Clin. Chem., **28**, 19—24.

Usategui-Gomez M., Wicks R. W., Warshaw M. (1979). Immunochemical deter-

mination of the heart isoenzyme of lactate dehydrogenase (LDH_1) in human serum, Clin. Chem., **25**, 729—734.
Usategui-Gomez M., Wicks R., Farrenkopf B. et al. (1981). Immunochemical determination of CK—MB isoenzyme in human serum: A radiometric approach, Clin. Chem., **27**, 823—827.
Vesel E. S., Bearn A. G. (1958). The heterogeneity of lactic and malic dehydrogenase, Ann. N. Y. Acad. Sci., **75**, 286—291.
Wang T. Y., Godfrey J. H., Graham L. G., Haddad M. N., Hamilton T. C. (1982). Clinical evaluation of immunochemical assay of lactate dehydrogenase isoenzyme I in early detection of acute myocardial in farction, Clin. Chem., **28**, 2152—2154.
Weider N. (1982). Laboratory diagnosis of acute myocardial infarction: Usefulness of determination of lactate dehydrogenase (LDH)-1 level and of ratio of LDH-1 to total LDH, Arch. Pathol. Lab. Med., **106**, 375—377.
Wevers R., Mul-Steinbush M., Soons J. (1980). Mitochondrial CK (EC 2.7.3.2) in the human heart, Clin. Chim. Acta, **101**, 103—111.
Wicks R. W., Usategui-Gomez M., Miller M., Warshaw M. (1982). Immunochemical determination of CK—MB isoenzyme in human serum: II. An enzymic approach, Clin. Chem., **28**, 54—58.
Wu A., Bowers G. (1982). Evaluation and comparison of immunoinhibition and immunoprecipitation methods for differentiating MB from BB and macro forms of creatine kinase isoenzymes in patients and healthy individuals, Clin. Chem., **28**, 2017—2021.
Yuu H., Ishizawa S., Takagii Y. et al. (1980). Macro creatine kinase A study on CK-linked immunoglobulin, Clin. Chem., **26**, 1816—1820.
Zweig M. H., Van Steirteghem A. C., Schecter A. N. (1978). Radio immunoassay of creatine kinase isoenzymes in human serum: Isoenzyme BB, Clin. Chem., **24**, 422—428.

Глава 22

Электрофоретический перенос в сочетании с иммуноферментным анализом

В. К. В. Тсанг, Д. Е. Берс, К. Хэнкок

Введение

Электроперенос в сочетании с ИФА (ИФАЭП; англ. Enzyme-linked Immunoelectrotransfer Blot, или EITB) (Tsang et al., 1983a) представляет собой подход к анализу белков, сочетающий в себе преимущества трех независимо разработанных физико-химических методов исследования. На первом этапе проводят электрофоретическое разделение сложной смеси биологических макромолекул с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-электрофорез в ПААГ). Затем осуществляют собственно электрофоретический перенос (электроблотинг) разделенных белков из геля на твердую подложку. Наконец, перенесенные белки выявляют на полученной таким образом реплике (блоте) с помощью прямого или непрямого иммуноферментного анализа (в одном из вариантов ELISA) или с применением антител, меченных радиоизотопами (в варианте РИА), и последующей радиоавтографии. Используют самые разнообразные методические варианты в рамках каждого из названных этапов анализа. При этом, как правило, удается получать результаты, отличающиеся высоким качеством с точки зрения разрешающей способности, чувствительности, достоверности и избирательности анализа.

Эффективность использования данного метода подтверждается стремительно возрастающим потоком посвященных ему публикаций. Начиная с первых опытов по белковому блотингу (Towbin et al., 1979) до многочисленных современных вариантов метода в библиографическом перечне MEDLARS II, составленном на май 1984 г., их можно насчитать более 250 (связанных с техникой переноса белков помимо методов переноса нуклеиновых кислот). Сегодня реальное число статей по белковому блотингу, несомненно, значительно больше.

Исторически начало использования методов переноса электрофоретически разделенных биомолекул связано с работами Саузерна (Southern, 1975). Термин «вестерн-блот», продолжающий традицию «географических» наименований методов переноса[1]), был предложен в публикации (Burnette,

[1]) Появление такой традиции обусловлено буквальным значением термина «Southern blot» («южный» перенос), исторически связанного с методом переноса фрагментов ДНК, разработанным Саузерном. По аналогии для про-

1981). Проводить регистрацию антигенов, разделенных ДСН-электрофорезом в ПААГ, с помощью антител, меченных пероксидазой (КФ 1.11.17), впервые было предложено в работе Raamsdonk et al., 1977.

В настоящей главе рассмотрение вариантов метода будет ограничено переносом белков и гликопротеинов после ДСН-электрофореза в ПААГ с последующей регистрацией антигенов методом ELISA. Даже при введении таких ограничений в рамках подобного рассмотрения невозможно охватить все публикации на эту тему. За дополнительной информацией по методам иммуноблотинга и иммунологического дот-анализа можно обратиться к обзору (Towbin, Gordon, 1984). Значительный интерес представляют и обзоры, посвященные методам белкового переноса (Gershoni, Palade, 1983), а также методам переноса после двухмерного электрофореза (Symington, 1984).

Белки, разделенные в геле с помощью ДСН-электрофореза, переносят на твердую подложку, например на нитроцеллюлозу или активированную бумагу (Renart et al., 1979). Считается, что активированная бумага, с которой перенесенные белки связываются ковалентно, обладает более высокой сорбционной емкостью, которая, к сожалению, проявляется и в более высоком фоновом связывании. На сегодняшний день наиболее популярным материалом матрицы для белкового переноса является нитроцеллюлоза. Методы фракционирования белков в геле с использованием ДСН-электрофореза и (или) изоэлектрофокусирования весьма многочисленны и разнообразны. В настоящей статье мы не будем их рассматривать, а при изложении материала будем считать, что у нас имеется гель, в котором с применением тех или иных электрофоретических приемов уже провели разделение белковых компонентов исследуемых образцов.

После появления подробной публикации по разработанному нами методу (Tsang et al., 1983a) и тем более с момента первого сообщения по его применению (Tsang et al., 1982) мы несколько модифицировали саму методику, что позволило повысить разрешение и сделать ее в целом менее трудоемкой. Методика, представленная в данной публикации, в настоящее время непосредственно используется в нашей и в ряде других лабораторий. Полученные с ее помощью результаты оказались весьма полезны для выявления сложных взаимодействий антиген—антитело при различных инфекциях. Данный метод был также эффективно использован для изучения ряда вопросов, связанных со специфичностью продуцируемых моноклональных антител.

цессов переноса РНК иногда используют термин «Northern blot» («северный» перенос), а для переноса белков — «Western blot» («западный» перенос). — *Прим. ред.*

Методы

А. Растворы

1. Буфер для переноса. 0,025 М Трис, 0,193 М глицин, 20%-ный метанол, pH 8,35. Значение pH такого буфера в зависимости от качества имеющихся реагентов может варьировать в диапазоне 7,8—8,4. Нет необходимости специально доводить pH буфера до названной величины, более существенно точное соблюдение выбранной молярности, а значит, и электропроводности. Мы используем трис особой чистоты производства фирмы Schwarz/Mann и глицин фирмы BDH. Сразу готовят 6 л такого раствора и хранят его при 4 °C. Его можно использовать многократно для проведения по крайней мере 20 переносов.

2. Раствор ФСБ-твин. К фосфатно-солевому буферу (ФСБ, 0,01 М Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, 0,15 М NaCl, pH 7,20) добавляют 0,3% твина-20 (полиоксиэтиленсорбитолмонолаурата, Sigma). ФСБ можно готовить в больших количествах (20—40 л), разливать в литровые бутыли, стерилизовать и хранить при комнатной температуре. Твин (3 мл на 1 л) добавляют к буферу при осторожном перемешивании непосредственно перед использованием.

3. Раствор субстрата. Смешивают 50 мг 3,3′-диаминобензидина (3,3′, 4,4′-тетрааминобифенилтетрагидрохлорида с содержанием основного вещества 97—99%, Sigma) и 10 мкл H_2O_2 (30%), добавляют ФСБ, pH 7,2, до 100 мл. Этот раствор готовят ежедневно.

Б. Подготовительные операции на стадии ДСН-электрофореза в ПААГ

Важно знать, каким образом на блоте располагаются зоны маркеров молекулярной массы. Для этого проще всего в отдельную лунку геля внести смесь предварительно окрашенных белковых стандартов. Смеси таких стандартов поставляются фирмой BRL, а методика работы с ними (обработка, построение калибровочных графиков) подробно описана (Tsang et al., 1985). Другой способ решения этой проблемы заключается в прокрашивании зон, соответствующих смеси стандартных белков на блоте, после переноса (Hancock, Tsang, 1983).

В. Методика электрофоретического переноса с последующим ИФА (ИФАЭП)

В этой методике используют ячейку для электропереноса (например, производства Bio-Rad Labs).

1. На листе нитроцеллюлозы (BA83, 0,2 мкм, поставляется

в 3-метровых рулонах фирмой Schleicher, Schuell) размером 16×21 см в 0,5 см от верхнего края проводят линию (*тонкопишущей* шариковой ручкой), которая будет служить для маркировки линии контакта нитроцеллюлозы с верхним краем геля. Нитроцеллюлозу вымачивают в буфере для переноса в течение 10 мин. *Внимание!* Смочите сначала одну сторону листа, затем другую. Если обе стороны будут погружены в жидкость одновременно, то внутрь листа могут захватиться пузырьки воздуха.

2. В кювету заливают около 300 мл буфера для переноса и помещают листок фильтровальной бумаги (15×20 см, типа GB002, Schleicher, Schuell).

3. Переносят гель на фильтровальную бумагу, погруженную в буфер. *Внимание!* Сначала верхняя часть геля (концентрирующий гель) должна находиться в жидкости, не касаясь бумаги. В противном случае гель прилипает к бумаге, что затрудняет его дальнейшее перемещение. Фильтровальную бумагу располагают таким образом, чтобы она находилась на дне и у края кюветы с буфером. После наложения на бумагу нижней части геля его аккуратно перемещают вдоль листа. После того как гель целиком разместится на бумаге, его вместе с бумагой извлекают из кюветы с буфером.

4. Бумагу с гелем (гелем наверх) кладут на специальную губку, входящую в комплект ячейки для переноса.

5. Смачивают поверхность геля 10 мл буфера для переноса. На поверхность геля помещают приготовленный лист нитроцеллюлозы: сначала, слегка согнув лист, на гель накладывают его середину, опускают правую часть листа на край разделяющего геля, а затем левую на край, граничащий с концентрирующим гелем. Из области контакта геля с нитроцеллюлозой тщательно удаляют воздушные пузырьки. *Внимание!* После соприкосновения нитроцеллюлозы с гелем разделить их довольно трудно. Удаления пузырьков воздуха и избытка жидкости между гелем и нитроцеллюлозой и обеспечения хорошего контакта между ними можно достичь, прокатывая по листу нитроцеллюлозы большую стеклянную пипетку. Если все же по тем или иным причинам (например, при попадании каких-либо частиц в область контакта) необходимо отделить нитроцеллюлозу от геля, это следует делать, начиная с той части, которая примыкает к нижнему краю разделяющего геля.

6. Поверх листа нитроцеллюлозы кладут еще один лист фильтровальной бумаги, смоченный буфером, и также прокатывают по нему пипетку.

7. Сверху накладывают вторую губку. Можно немного надрезать край этой губки, помечая тем самым, что именно с этой стороны находится нитроцеллюлоза.

8. Собранный таким образом «сэндвич» помещают в специальную пластиковую рамку. Стягивают рамку с помощью резинки, натягивая ее посредине вдоль длинной оси рамки. Важно жестко стянуть «сэндвич» для обеспечения хорошего контакта между всеми его слоями. Новые модели аппаратов для переноса (например, фирмы Bio-Rad) комплектуются специальными скользящими зажимами, надежно фиксирующими весь «сэндвич».

9. Собранную форму медленно погружают в ячейку с буфером, следя за тем, чтобы лист нитроцеллюлозы (т. е. губка с надрезанным краем) был обращен в сторону анода.

10. Электрофоретический перенос ДСН-белковых комплексов достигается за 3 ч при 4 °С при постоянном напряжении 100 В. Перенос можно проводить и в течение ночи при 60 В. Увеличение времени переноса, по нашим наблюдениям, не сопровождается сколь-нибудь существенными изменениями.

При проведении электропереноса на свежеприготовленном буфере сила тока при напряжении 100 В составляет обычно 200 мА. При использовании «старого» буфера эта величина может достигать 800 мА. Мы рекомендуем готовить новый буфер каждые 2 месяца или после проведения 20 циклов электропереноса (если он хранится в закрытой посуде при 4 °С). *Внимание!* Лучше избегать использовать старый буфер для переноса в течение ночи ввиду его более высокой электропроводности (возможно, из-за накопления ДСН), которая приводит к повышению силы тока и интенсивному тепловыделению в ходе переноса. Температура буфера при 60 В в этих условиях может достичь точки кипения, и выделяющиеся пары метанола могут воспламениться. Поэтому, если нет высокоэффективной системы внутреннего охлаждения, мы не рекомендуем использовать старый буфер для переноса в течение ночи. Использование старого буфера нежелательно также в тех случаях, когда в нем содержится заметная примесь белков, которые могли попасть туда в результате «подтекания» из геля (например, при перегрузке белковых зон).

11. По окончании переноса «сэндвич» разбирают, оставляя в контакте только сам гель и лист нитроцеллюлозы. Отмечают границы разделяющего геля и положение маркеров молекулярной массы. Нитроцеллюлозу отделяют от геля, начиная от нижнего края разделяющего геля, постепенно продвигаясь по направлению к концентрирующему гелю. Прилипшие к нитроцеллюлозе кусочки концентрирующего геля можно удалить сначала сухим, а потом смоченным буфером кусочком марли.

12. Лист нитроцеллюлозы (блот) промывают 4 раза по 5 мин раствором ФСБ—твин, желательно при 37 °С (можно и при комнатной температуре). Объем раствора для каждой промывки около 250 мл.

13. При анализе единичного образца (который наносят в одну лунку шириной в целый гель и который после электрофо-

реза и переноса представлен в виде набора полос, идущих по всей ширине листа) блот помещают на лист пластика (например, пленку «Write-On») и разрезают на продольные полоски шириной по 0,5 см. При анализе различных образцов в одном геле блот не разрезают, а обрабатывают целиком.

14. Готовят разведение антител (антисыворотки или препарата моноклональных антител) в растворе ФСБ—твин. Степень разведения зависит от содержания антител. При анализе заболеваний, вызываемых паразитами, мы обычно работали с разведением сыворотки 1 : 200—1 : 1000. При использовании супернатантов моноклональных культур обычно готовили разведение 1 : 2—1 : 100, а в случае жидкости из моноклональных асцитов — 1 : 200—1 : 50 000. Для обработки полоски 0,5×20 см достаточно 5 мл, а для листа 18×20 см — 100 мл препарата разведенных антител.

15. Обработку листов проводят в пластиковых кюветах, а полосок — в лотках, разделенных на секции (Tsang et al., 1983a), выпускаемых фирмой Bio-Rad Labs (номер по каталогу 170—4037).

16. Полоски и листы инкубируют в антисыворотке 1 ч при комнатной температуре или ночь при 4 °С, осторожно перемешивая на ротационном встряхивателе. Мы предпочитаем инкубацию в течение ночи в тех случаях, когда реальное содержание антител и уровень аффинности заранее неизвестны.

17. Блот промывают 4 раза по 5 мин в растворе ФСБ—твин при комнатной температуре.

18. Инкубируют 1—2 ч с аккуратным встряхиванием в растворе ФСБ—твин, содержащем вторые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Поскольку данный метод представляет собой качественный анализ, для которого наиболее важным фактором является чувствительность, мы рекомендуем использовать высокополимерные конъюгаты (Tsang et al., 1984a).

19. Промывают блот 4 раза по 5 мин в растворе ФСБ—твин и один раз в ФСБ. В последнем растворе его можно держать до 4 ч без видимого снижения активности индикаторного фермента.

20. После промывки блот помещают на 5—10 мин в раствор субстрата. Полосы проявляются обычно в течение 10 мин. Реакцию останавливают, промывая блот водой. *Внимание*! Предполагают, что 3,3-диаминобензидин — потенциальный канцероген, поэтому следует очень тщательно промывать проявленный блот водой.

Г. Фотографирование и хранение блотов

Нитроцеллюлозные блоты после проявления могут сохраняться в сухом виде, но перед фотографированием их желательно смочить водой. По нашему опыту простого протирания поверхности влажной губкой достаточно для заметного усиления интенсивности полос. Обычно для фотографирования мы используем фотокопировальную систему Polaroid MP3 с желатиновым фильтром типа Kodak 38A (синий) и позитивно-негативную пленку типа Polaroid 55. С негативных отпечатков на этой пленке (при соответствующем процессе печати) могут быть получены качественные изображения, пригодные для публикации. Прямое освещение для фотографирования создают при помощи четырех фотоосветителей мощностью по 150 Вт.

Перед фотографированием блота, разрезанного на отдельные полоски, помещают рядом полоски с проанализированным образцом и полоску со стандартами молекулярной массы и выравнивают их по линии, проведенной на листе нитроцеллюлозы перед переносом. Полоски можно разложить на белой бумаге или на прозрачной пленке, а сверху закрыть еще одним листом пленки.

Д. Денситометрирование

Денситометрирование блотов проводят для точного соотнесения результатов с профилем белкового прокрашивания геля, получения и сравнения количественных данных для различных блотов.

После фиксации, окрашивания белковых зон и отмывания фона полиакриламидные гели по размеру часто существенно отличаются от соответствующих блотов, что затрудняет установление соответствия полос на блоте и в геле. С помощью сканирующего денситометра, работающего в режиме отражения/пропускания, можно представить полученные результаты в форме, более удобной для непосредственного выявления такого соответствия.

При использовании одного блота для анализа серии различных образцов проведение денситометрирования в режиме отражения с интеграцией пиков позволяет определить относительное содержание антигена в этих образцах. Если некоторые из образцов содержат известные количества антигена, то можно определить и абсолютные количества антигена в пробах. После денситометрирования и обсчета пиков стандартов строят калибровочную кривую, по которой и определяют содержание антигена в анализируемых образцах.

Типичные результаты

А. Различные препараты антигена/один препарат антител

На рис. 22-1 показаны возможности метода ИФАЭП при сравнении препаратов с разным содержанием антигенов. В качестве образцов могут фигурировать различные фракции, полученные в ходе очистки антигена (как в данном случае), или содержащие антиген препараты из различных источников. После переноса блот обрабатывают одним стандартным препаратом антител для сравнения антигенной активности в образцах.

Рис. 22-1, *Б* и 22-1, *В* позволяют сравнить блоты, полученные в результате электропереноса в различных буферных системах. В качестве анализируемых образцов используют фракции, полученные при выделении антигенов из зрелых особей *Schistosoma mansoni* (Tsang et al., 1983b, c). На рис. 22-1, *А* представлена картина, наблюдаемая при окрашивании серебром геля после ДСН-электрофореза в ПААГ тех же образцов (Tsang et al., 1984b). Блот, показанный на рис. 22-1, *Б*, был получен при переносе в течение 2 ч в буфере 0,025 М трис — 0,193 М глицин, pH 8,35, содержащем 20% метанола, при напряжении 100 В и токе 200 мА с охлаждением (4 °С). На рис. 22-1, *В* представлен аналогичный блот, полученный при переносе в 0,424 М буфере трис-HCl, pH 9,18, содержащем 20% метанола. Проводимость этого буфера, который мы использовали в процессе самого электрофореза в составе разделяющего геля (Tsang et al., 1983a), существенно выше, поэтому при том же напряжении 100 В сила тока достигала 1400 мА. Однако полученный в этих условиях блот по качеству не уступает тому, который получают при обычном режиме переноса (рис. 22-1, *Б*). Более того, разрешение полос на блоте рис. 22-1, *В* оказывается даже более высоким, чем в случае рис. 22-1, *Б*. Эффективность переноса высокомолекулярных компонентов, как видно из сравнения крайних правых дорожек на блотах, также несколько выше в случае рис. 22-1, *В*.

На рис. 22-1, *Г* показан блот, полученный при переносе с такого же геля в буфере, не содержащем метанола. При наглядном сходстве всех полученных картин следует отметить, что к концу 2-часового периода переноса в отсутствие метанола гель начинает разбухать, что при более длительном (ночном) переносе может проявляться в виде существенного искажения зон.

Б. Один препарат антигена/различные препараты антител

На рис. 22-2 приведены данные сравнения активности препаратов антител из различных источников против одного препарата антигена. Препарат смеси микросомных антигенов под-

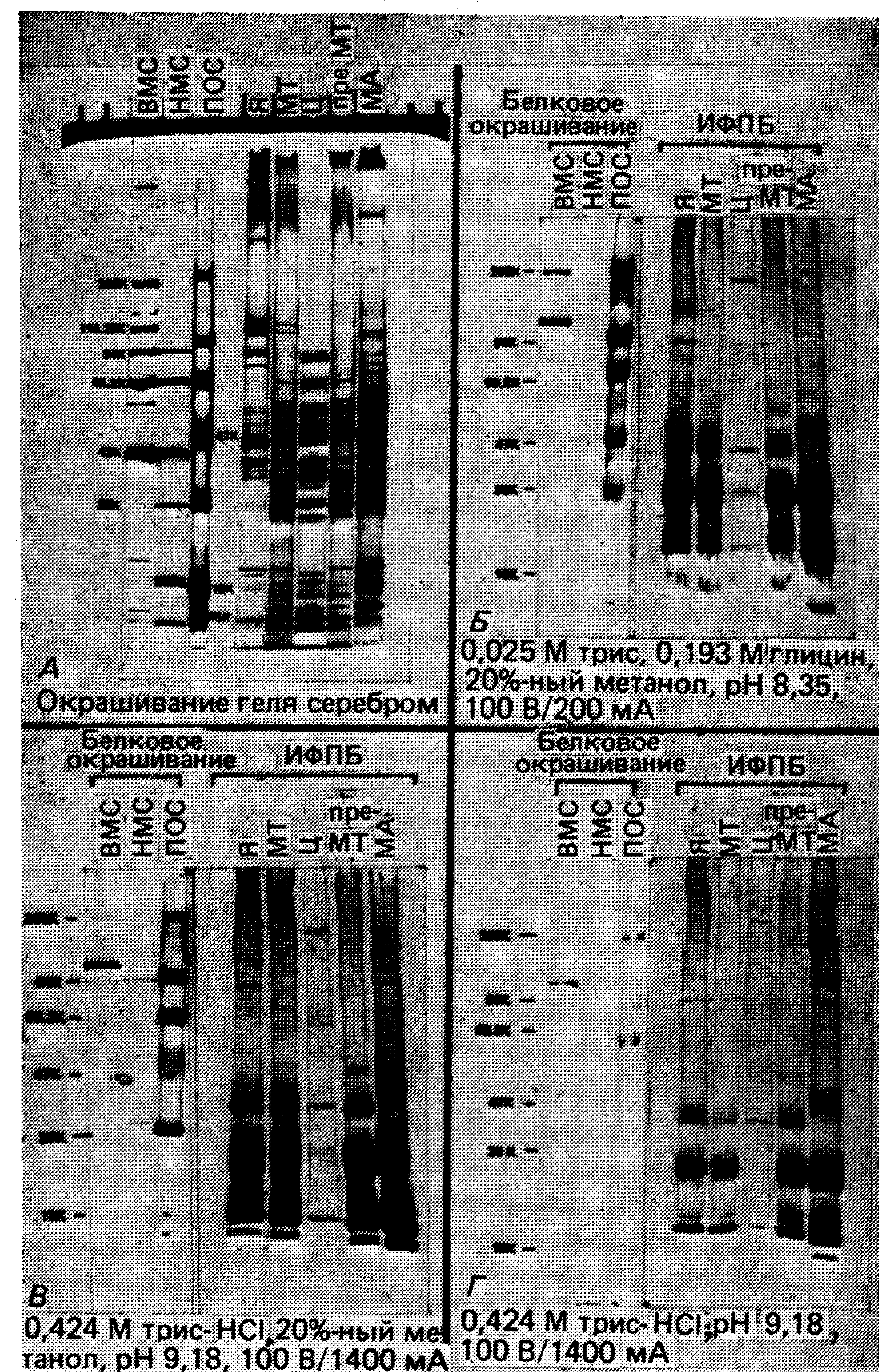


Рис. 22-1. *А*. Электрофорез фракций, полученных при выделении антигенов *Schistosoma mansoni* (окрашивание серебром). *Б*, *В* и *Г* — блоты, полученные при переносе с гелей, идентичных использованному в *А*, в различных буферных системах. Анализировали следующие фракции: Я — ядерную, МТ — митохондриальную, Ц — цитоплазматическую, пре-МТ — премитохондриальную. Дорожка «МА» соответствует образцу микросомных антигенов зрелых особей *S. mansoni* (Tsang et al., 1983b). На каждую дорожку было нанесено по 1,5 мкг суммарного белка. На каждом рисунке слева отмечены положения маркеров молекулярной массы (в килодальтонах). ИФПБ — иммуноферментное проявление блота, ВМС — высокомолекулярные стандарты, НМС — низкомолекулярные стандарты, ПОС — предварительно окрашенные стандарты.

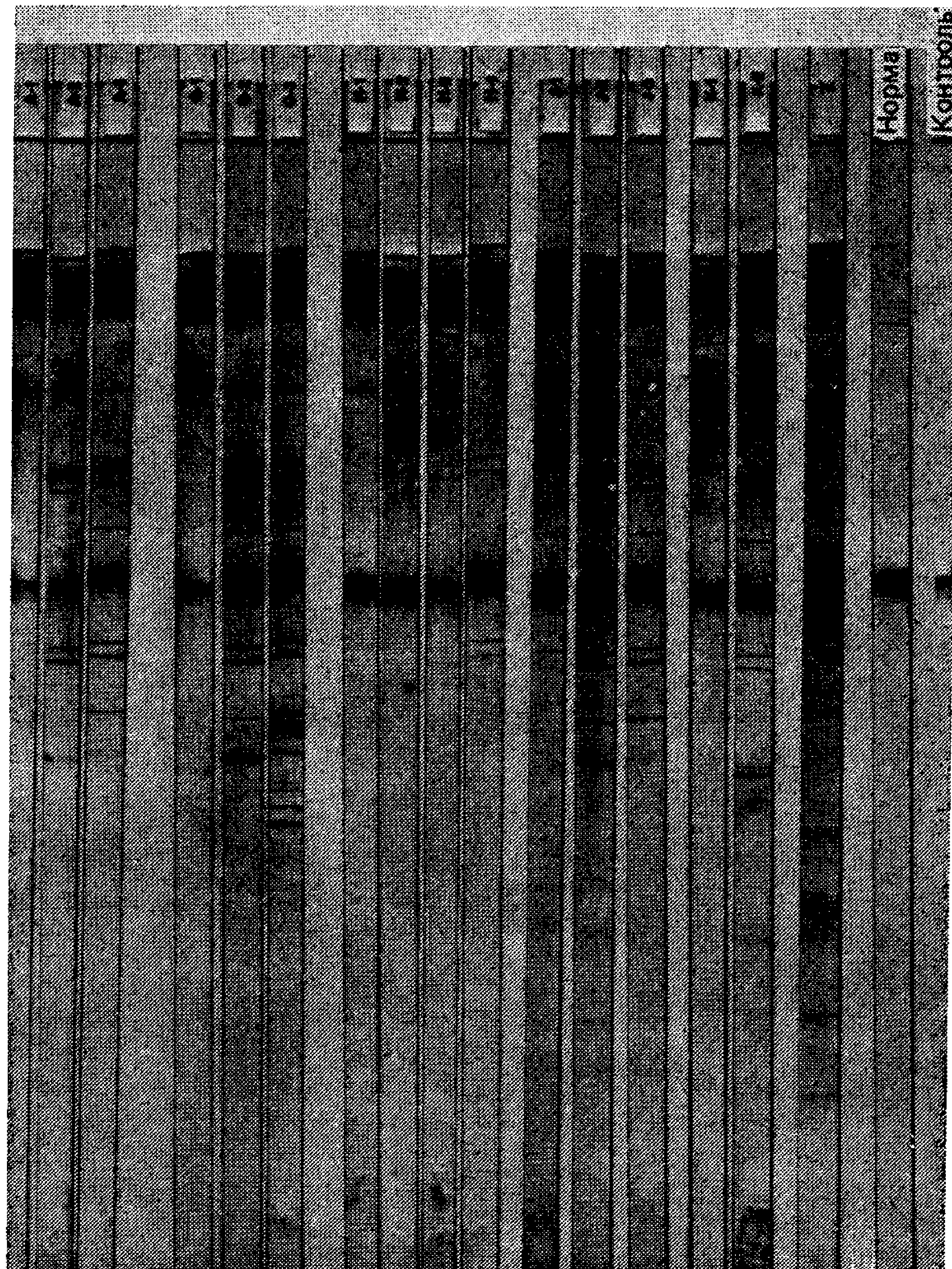


Рис. 22-2. Блот, полученный после электрофореза одного образца микросомных антигенов зрелых особей *S. mansoni*, разрезали на полоски шириной 0,5 см. Полоски инкубировали в препаратах сыворотки больных с различными заболеваниями. В сериях A, G, H, J, K представлены препараты сыворотки от 5 больных с острой инвазией, полученные на различных этапах заболевания (в диапазоне от 6 нед до 2 мес). Сыворотка Z получена от больного с хронической инвазией. Норма соответствует сыворотке донора, не подвергавшегося инвазии *S. mansoni*. Контроль — обработка солевым раствором, не содержащим какой-либо сыворотки.

вергали ДСН-электрофорезу, нанося препарат на гель одной широкой полосой (Tsang et al., 1983b, c), и затем — электропереносу. Блот разрезали на полоски шириной 0,5 см и проявляли в 7 различных сыворотках. Сыворотки A, G, H, J и K были получены от пяти больных с острой инфекцией на различных стадиях заболевания и лечения. Образцы сыворотки, помеченные одним и тем же буквенным символом, относятся к одному и тому же больному. Цифры отражают различные этапы протекания инфекции, на которых производили отбор сыворотки. Сыворотки, обозначенные Z и Норма, получены от больного с хронической инфекцией и неинфицированного донора соответственно. Контрольную полоску антисывороткой не обрабатывали. Для препаратов сыворотки, соответствующих различным этапам заболевания каждого из больных, наблюдаются изменения в спектре специфичности антигенов. Видны также и индивидуальные различия между препаратами сыворотки отдельных больных. Различия между препаратами сыворотки, полученными от различных больных на стадии возникновения инфекции, а также между препаратами, соответствующими различным стадиям заболевания одного и того же больного, еще более отчетливо выявляются при использовании в качестве анализируемого образца смеси антигенов, полученной без предварительного фракционирования.

Эксперименты, подобные тем, которые показаны на рис. 22-2, весьма полезны для определения специфичности, а также для «эпитопного картирования» той или иной системы антиген—антитело.

В. Пределы чувствительности метода

По-видимому, предела чувствительности метода электропереноса с последующим ИФА достигнуть еще не удалось. Весьма вероятно, что доступную на сегодняшний день чувствительность в ближайшем будущем удастся заметно повысить за счет улучшения качества конъюгатов и использования более чувствительных субстратов. Применение нашей методики позволяет в системе [БСА — антитела против БСА] регистрировать антитела при их концентрации в растворе 10 нг/мл, а антиген — в количестве 10 нг на 0,5-сантиметровую полоску. При этом мы используем кроличьи поликлональные антитела. Применение моноклональных антител для обнаружения антигенов патогенных паразитов позволяет повысить чувствительность обнаружения до 50 пкг. Полагают, что предел чувствительности обнаружения антигенов на блоте с помощью ИФА может достигать 10—20 пкг. Не исключено, что применение более чувствительной системы фермент—субстрат позволит выйти за рамки названных ограничений чувствительности метода.

Обсуждение

Наши собственные работы, а также опубликованные данные многих других лабораторий указывают на то, что методы, основанные на технике блотинга (включая самые различные варианты), являются весьма мощным и полезным инструментом иммунохимического анализа. Начиная с момента возникновения метода (Southern, 1975), количество публикаций, связанных с его использованием, растет буквально как снежный ком, свидетельствуя о том, что метод получил самое широкое признание среди ученых всего мира. Метод электропереноса с последующим ИФА сочетает в себе преимущества, предоставляемые очень высокой разрешающей способностью электрофореза, с исключительной чувствительностью и специфичностью методов ИФА. Большое разнообразие опубликованных вариантов метода может привести к ошибочному заключению о том, что качество переноса слабо зависит от конкретных условий эксперимента, и даже самый небрежный лаборант может легко получить хорошие результаты, не заботясь особенно о стандартизации и тщательности проведения тех или иных операций. Однако следует отметить целый ряд факторов, требующих к себе очень внимательного отношения, поскольку они могут весьма существенно сказаться на результатах, получаемых при помощи этого метода. Некоторые из них будут рассмотрены ниже.

Антигенные свойства белков после переноса

Принято считать, что обработка белков ДСН вызывает у них сильные конформационные изменения, которые могут приводить к изменению структуры или к полной утрате антигенных детерминант и активных центров ферментов. В то же время без такой обработки невозможно добиться того, чтобы все белки несли отрицательный заряд и мигрировали к аноду в условиях электрофоретического фракционирования и переноса. То, что обработанные ДСН белки после переноса проявляют антигенную активность, может объясняться их частичной ренатурацией после удаления додецилсульфата в ходе отмывки блота. Другое возможное объяснение заключается в том, что антигенная активность, обнаруживаемая на блотах, связана только с теми эпитопами белков, которые зафиксированы непосредственно на уровне первичной структуры. Не исключено, что возможность обнаружения антигенов после обработки ДСН и переноса в действительности обусловлена сочетанием обоих названных факторов. В пользу первого предположения свидетельствуют результаты обнаружения как нативных, так и обработанных ДСН белков с помощью различных моноклональных антител. Более того, нам удавалось непосредственно зарегистрировать ферментативную активность пероксидазы, предварительно подвергнутой обработке ДСН при 37 °С, электрофорезу в ПААГ и электропереносу (Tsang et al., 1984a). Эти данные свидетельствуют о том, что денатурация додецилсульфатом действительно обратима. Пока неизвестно, происходит ли удаление связанного с белком ДСН и восстановление антигенных детерминант непосредственно при переносе (благодаря присутствию метанола) или при последующих отмывках в присутствии неионных детергентов.

Особенности применения моноклональных антител

Для широкого набора белковых антигенов было показано, что поликлональным или моноспецифическим антителам присуща высокая специфичность связывания с соответствующими антигенами на блотах, полученных после ДСН-электрофореза в ПААГ. В то же время использование для этих же целей моноклональных антител сопряжено с некоторыми особыми проблемами. В ряде случаев удается успешно обнаруживать денатурированные антигены (например, при окрашивании единичных зон; O'Connor et al., 1982; Caceres et al., 1984; Colcher et al., 1983; Steineman et al., 1984; Braun et al., 1983; Turner, 1983; Ogata et al., 1983; Flaster et al., 1983). Однако известны и такие примеры, когда наблюдалось: 1) полное исчезновение антигенной активности (Steineman et al., 1984; Braun et al., 1983; Turner, 1983; Mandrell et al., 1984; Irons et al., 1983) или 2) колебания в интенсивности окрашивания (Steineman et al., 1984; Braun et al., 1983; Turner, 1983; Mandrell et al., 1984; Irons et al., 1983) и 3) окрашивание множественных зон (Braun et al., 1983; Turner, 1983; Ogata et al., 1983; Flaster et al., 1983; Anderson et al., 1982). Это не вызывает особого удивления, поскольку моноклональные антитела в каждом случае специфичны лишь к одной определенной антигенной детерминанте нативного белка, которая с определенной вероятностью может необратимо разрушаться в денатурирующих условиях ДСН-электрофореза. Отчасти подобные проблемы можно решить, используя моноклональные антитела, полученные непосредственно к денатурированным белкам.

Разрушение антигенных детерминант, которое, вероятно, и препятствует взаимодействию моноклональных антител с белками на блоте, может быть вызвано совместным действием целого ряда факторов. Это, в первую очередь, присутствие детергентов, хаотропных агентов, мочевины, а также действие протеаз, механические или тепловые повреждения, т. е. те факторы, которые могут влиять на белки в ходе приготовления образцов и собственно электрофореза. Нарушение структуры отдельных детерминант может происходить также и во время

электропереноса под влиянием детергентов, метанола, изменений в значениях pH и ионной силы. Частичное разрушение антигенных детерминант может проявляться в том, что интенсивность иммунологического окрашивания будет заметно варьировать, особенно при использовании антител с малой аффинностью или низким титром. Проявление множественных полос на блоте можно интерпретировать как результат узнавания моноклональными антителами очень коротких участков аминокислотной последовательности, присутствующих одновременно в нескольких белках. Возможно, экспонирование подобных «повторяющихся» детерминант происходит при денатурации белков. Одной из причин появления сходных антигенных детерминант у разных белков может служить сходный характер их посттрансляционной модификации. В любом случае взаимодействие моноклональных антител с соответствующим антигеном на блоте, по-видимому, зависит от случайного стечения обстоятельств.

Желательно предварительно проверять имеющиеся препараты моноклональных антител на их пригодность для обнаружения антигенов на блоте. Для этого можно использовать специальный прибор для микротитрования с системой прокачивания растворов (типа прибора Bio Dot фирмы Bio Rad). Искомый антиген как нативный, так и денатурированный наносят на нитроцеллюлозные фильтры в виде небольших пятен (так называемый дот-анализ). Обрабатывая такие фильтры различными препаратами моноклональных антител, можно отобрать такие препараты, которые взаимодействуют с денатурированным антигеном и, следовательно, пригодны для проявления соответствующих блотов. Моноклональные антитела, не реагирующие с денатурированным антигеном, отбрасывают или подвергают дополнительной проверке, варьируя условия связывания и отмывки.

Типы биологических молекул, которые можно анализировать методом электропереноса

К числу биополимеров, которые могут быть подвергнуты электропереносу и анализу на блоте, помимо обычных белков относятся липопротеины (Huang et al., 1983), гликопротеины (Glass et al., 1981; Schott et al., 1984; Hawkes, 1982) и даже липополисахариды (Peppler, 1984; Cousland, Poxton, 1983; Chart et al., 1984). Конечно, следует упомянуть и нуклеиновые кислоты, на которых впервые были разработаны основы блот-анализа (Southern, 1975). По-видимому, подходящие условия электрофоретического переноса и адсорбции на соответствующих матрицах могут быть найдены для любых заряженных молекул.

Матрицы для блота

В настоящее время для получения блотов используют несколько типов носителей, или матриц. Наиболее популярны нитроцеллюлозные листы (типа BA83, 0,2 мкм, и BA85, 0,45 мкм; Schleicher, Schuell), диазобумага (типа APT-paper или ABM-paper; Bio Rad Labs) и несущие положительный заряд нейлоновые листы («Zeta-Probe», Bio-Rad Labs). Методы переноса, основанные на применении этих матриц, рассмотрены в обзоре (Symington, 1984). Вообще говоря, диазобумага обладает более высокой сорбционной емкостью, она связывает белки ковалентно, что позволяет подвергнуть один и тот же блот нескольким последовательным циклам связывания—диссоциации с различными реагентами. Использование диазобумаги ограничено высоким уровнем фона и трудоемкостью самого процесса, включающего дополнительные стадии активации и тщательного блокирования избыточных групп. Диазобумагу обычно не удается использовать для ИФА-блотов, поскольку в ходе активации она приобретает оранжевую или красно-коричневую окраску, что осложняет последующую визуализацию зон ферментативного окрашивания. Аналогичные проблемы высокого фона и необходимости тщательно блокировать избыточные центры сорбции возникают при использовании заряженных нейлоновых мембран. Тем не менее их выгодно использовать в тех случаях, когда присутствие метанола является нежелательным или требуется достичь высокого уровня адсорбции (до 480 мкг/см²).

С нитроцеллюлозными мембранами работать сравнительно легко, к тому же они относительно недороги. Для блокирования избыточных центров адсорбции часто оказывается достаточным включить в состав всех буферных растворов 0,3% твина-20 (Tsang et al., 1983a, b, c; 1984b). В то же время возможности многократного использования одного блота в этом случае ограничены примерно тремя циклами связывание—диссоциация (Legocki, Verma, 1981).

Буферные растворы и электрические параметры при электропереносе

Требования к электрическим параметрам при переносе обычно выражают в единицах напряженности поля, которая зависит от состава буферного раствора (т. е. проводимости), а также расстояния между электродами и выражается в В/см. Поскольку с повышением напряженности поля должна возрастать и эффективность электропереноса, особенно в случае крупных молекул, повышение разности потенциалов или сближение электродов должно способствовать уменьшению времени и увеличению полноты переноса крупных белков. В то же время для буферных растворов с высокой проводимостью увеличение на-

пряжения сопровождается значительным возрастанием силы тока и выделением тепла. В связи с этим возникает необходимость в охлаждении. В качестве примера можно рассмотреть результаты, полученные в опытах по электропереносу миозина (мол. масса 220 000) из 10%-ного геля (после ДСН-электрофореза по Лэммли) в стандартном буфере (Towbin et al., 1979) в течение 3 ч. При напряженности поля 55 В/см (220 Вт) и температуре 0 °С эффективность переноса миозина достигала 60%. Температура циркулирующей охлаждающей жидкости к концу третьего часа достигала 40 °С. Можно сравнить этот результат со всего лишь 10%-ной эффективностью переноса при комнатной температуре и традиционной для электропереноса напряженности поля 7,5 В/см (9 Вт). Как правило, низкую напряженность поля используют для переносов, осуществляемых за длительный период (в течение ночи) и (или) без охлаждения. Для ускорения экспериментов мы предпочитаем проводить электроперенос, когда это возможно, при высоком напряжении с охлаждением (4 °С). По нашим наблюдениям, при быстром переносе фоновое окрашивание при последующем проявлении блотов оказывается ниже.

Чаще всего для электропереноса используют буферный раствор следующего состава (Towbin et al., 1979): 0,025 М трис, 0,193 М глицин и 20% метанола, pH 8,3. Для переноса большинства белков в этом буфере достаточно проводить процесс при напряжении 60 В (7,5 В/см) и токе от 200 до 800 мА в течение 3 ч. Мы предпочитаем проводить перенос белков в широком диапазоне молекулярных масс (от 10 000 до 1 000 000) при напряжении 100 В, токе 200—800 мА и температуре 4 °С в течение 3 ч. В работе (Erickson et al., 1982) количественный перенос белков из синаптосом мозга достигался при введении в трис-глициновый буфер 0,1% ДСН. Было предложено также для облегчения ренатурации мембранных белков после электрофореза проводить перенос с добавлением 0,4% цвиттерионного детергента в стандартный буфер и 0,1% в состав геля (Mandrell, 1984). Это позволяет проводить последующее обнаружение антигенов на блоте с использованием моноклональных антител. В работе (Mandrell, 1984) показано, что после переноса без добавки цвиттерионного детергента, так же как при добавлении ДСН или неионных детергентов, антигенной активности на блотах обнаружить не удается. Пеплер (Peppler, 1984) для электропереноса липополисахаридов использовал 50 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,5. Перенос аполипопротеинов проводили в 25 мМ фосфатном буфере, pH 6,5, в течение 16 ч при силе тока 0,5 А (Huang et al., 1983). Для переноса белков после нативного электрофореза в отсутствие ДСН в геле, содержащем мочевину, в работе (Towbin et al., 1979) использовали 7%-ную уксусную кислоту.

Вообще говоря, перенос белков, обработанных ДСН, можно проводить в том же буфере, в котором проводят собственно электрофоретическое фракционирование. Это подтверждают наши результаты, приведенные в предыдущем разделе. В качестве буфера для переноса мы использовали наш рабочий буфер для электрофореза (0,424 М трис-HCl, pH 9,18) с добавлением 20% метанола. Полученные при этом результаты по качеству не уступают результатам переноса в трис-глициновом буфере. Единственным неудобством использования электрофорезного буфера для переноса является его более высокая проводимость. Ток при переносе в этом буфере значительно выше, вследствие чего требуется гораздо более интенсивное охлаждение. Снизить значение тока (до 1,2 А при 100 В) без потерь при переносе удается, вдвое уменьшив молярность буфера, т. е. работая с 0,212 М трис-HCl, pH 9,18, содержащим 20-% метанола. Включение метанола в буфер для переноса предотвращает разбухание геля. Кроме того, метанол может помогать извлечению ДСН из комплекса с белками и тем самым способствовать их ренатурации. В то же время в присутствии метанола некоторые белки преципитируют в геле, что осложняет их количественное извлечение из геля, особенно в случае крупных белков.

Общие положения, касающиеся выбора буферной системы и электрических параметров при переносе

Общая стратегия при выборе подходящего буфера для переноса сводится к поиску системы, обеспечивающей высокую напряженность поля (В/см) при возможно более низком токе и тепловыделении. Значение pH буфера при переносе белков, обработанных ДСН, на нитроцеллюлозную мембрану обычно не имеет большого значения. Напомним, что метанол, который входит обычно в состав буфера для переноса, способствует диссоциации комплекса ДСН—белок и, таким образом, облегчает ренатурацию и связывание с нитроцеллюлозой. Однако следует учесть, что такое действие метанола может приводить к нейтрализации необходимого для переноса отрицательного заряда комплексов ДСН—белок, что особенно нежелательно в случае переноса осно́вных (несущих собственный положительный заряд) белков.

Элюция высокомолекулярных белков или плохо растворимых белковых компонентов мембран из геля после ДСН-электрофореза часто оказывается сопряжена со значительными трудностями. Для их преодоления, как правило, используют два приема: 1) исключение метанола из состава буфера для переноса и 2) введение в буфер добавок ДСН или других детергентов. Удаление метанола, повышая эффективность элюции, сопровождается некоторым снижением сорбционных возможностей нит-

Таблица 22-1. Буферные растворы, используемые для электропереноса белков после ДСН-электрофореза в ПААГ

Источник данных	Буферный раствор
Towbin et al., 1979	25 мМ трис, 192 мМ глицин, рН 8,3, 20% метанола
Erickson et al., 1982	25 мМ трис, 192 мМ глицин, рН 8,3, 20% метанола, 0,1% ДСН
Nielsen et al., 1982	25 мМ трис, 192 мМ глицин, рН 8,3, 0,01% ДСН
Mandrell et al., 1983	25 мМ трис, 192 мМ глицин, рН 8,3, 20% метанола, 0,1—0,4% Empigen BB и другие неионные или цвиттерионные детергенты
Schott et al., 1984	125 мМ трис, 96 мМ глицин, 0,1% ДСН, 20% метанола
Glass et al., 1981	125 мМ трис, 96 мМ глицин, 20% метанола
Anderson et al., 1982	25 мМ трис, 192 мМ глицин
Burnette, 1981	20 мМ трис, 150 мМ глицин, рН 8,3, 20% метанола
Gershoni et al., 1982	15,6 мМ трис, 120 мМ глицин, рН 8,3, 20% метанола
Davis et al., 1983	20 мМ трис-ацетат, 2 мМ ЭДТА, рН 7,5, 0,01% ДСН
Gershoni et al., 1982	41 мМ трис, 40 мМ борат, рН 8,3
Reiser et al., 1981	10 мМ Na-борат, рН 9,2
Huang et al., 1983	25 мМ фосфат, рН 6,5
Nelson et al., 1984	10 мМ трис-HCl, 20 мМ HEPES, рН 7,56, 0,1% ДСН, 0,1 мМ дитиотрейтол, 20% этанола
Granger et al., 1984	20 мМ трис-ацетат, рН 8,3, 0,1% ДСН, 0,1 мМ дитиотрейтол, 20% изопропанола
Stefansson et al., 1983	20 мМ трис-HCl, рН 7,5, 20% метанола
Sutton et al., 1982	10 мМ трис, 77 мМ глицин, рН 8,3, 0,1% ДСН
Griesser et al., 1983	10 мМ Na-ацетат, рН 5,2
Carson et al., 1983	10 мМ трис-HCl, рН 8.5
Goldstein, 1983	50 мМ NaH_2PO_4/Na_2HPO_4, рН 7,4
Fujita et al., 1983	50 мМ Na-борат, рН 8,5
Tsang et al. (настоящая публикация)	0,424 М трис-HCl, рН 9,18, 20% метанола или 0,212 М трис-HCl, рН 9,18, 20% метанола

роцеллюлозы. Введение детергентов может ослаблять связывание белков с отрицательно заряженной (при рН 8,3) поверхностью нитроцеллюлозы, а также ухудшать антигенные свойства белков и приводить к заметному увеличению электропроводности и тепловыделения.

Буферные растворы на основе триса (трис-боратный, трис-ацетатный, трис-глициновый) позволяют достигать максимальной напряженности поля при минимальном токе и поэтому являются наиболее удобными для переноса белков из геля на нитроцеллюлозные или нейлоновые мембраны. Для дополнительного увеличения напряженности поля без усиления тока стандартные буферные растворы часто разводят в 2—4 раза. Буферные растворы на основе Na-фосфата или ацетата менее удобны, поскольку они характеризуются высокой электропроводностью и соответственно избыточным тепловыделением, а также подвержены довольно быстрому разложению с изменением рН и ионной силы.

Некоторые используемые буферные системы приведены в табл. 22-1.

Неспецифические взаимодействия и блокирующие их реагенты

При проведении электропереноса с последующим иммуноферментным проявлением блота возможны осложнения, связанные с фоновыми явлениями трех типов: 1) фоновое окрашивание всей поверхности носителя, 2) неспецифическое окрашивание отдельных зон за счет примесей или перекрестной реакционной способности препарата первых антител и 3) нонсенс-окрашивание зон за счет взаимодействия со вторыми антителами (без предварительной обработки первыми антителами) или с индикаторным реагентом.

Окрашивание всей поверхности носителя может проявляться при недостаточном блокировании центров сорбции. Однако чаще оно обусловлено слишком высокой концентрацией вторых антител, использованием недостаточно чистого конъюгата (рекомендуется использовать препараты, подвергнутые аффинной очистке) или отсутствием мягкого детергента на этапах отмывки. Развитие фонового окрашивания второго типа, по-видимому, связано со слишком высокой концентрацией первых антител. Более всего хлопот доставляет, как правило, именно нонсенс-окрашивание. Оно часто проявляется даже при работе с высокоочищенными препаратами вторых антител. Это, вероятно, обусловлено сильным неспецифическим гидрофобным взаимодействием очень крупных комплексов [антитела—фермент] с белками на носителе. Появлению такого окрашивания способствует работа в условиях перегрузки антигенами, т. е. при нанесении на гель избыточных количеств анализируемого материала.

Для подавления или ослабления фонового окрашивания этого типа можно проводить дополнительное блокирование центров сорбции раствором белка и затем обрабатывать блот раствором твина-20. В тех случаях, когда имеет место фоновое окрашивание типа 3, использование одного твина-20 может оказаться недостаточной мерой. Целесообразно вводить твин

20 (0,05%) и белок-носитель (например, 1%-ный БСА, желатину или нормальную сыворотку) в растворы на обеих стадиях взаимодействия с антителами, а также твин-20 (0,05%) в отмывочные растворы. Использование более высокой концентрации твина-20 или других детергентов (типа NP-40, ДСН, тритона X-100 и т. п.) может вызывать частичную десорбцию белков с носителя (Bjernum, Larsen, 1983).

При использовании для блотов матриц с ковалентным связыванием, например диазобумаги (Renart et al., 1979), возникает необходимость в блокировании или инактивации избыточных (диазониевых) центров связывания после переноса. В работе (Renart et al., 1979) для этих целей использовали трис, этаноламин или желатину. При работе с другими матрицами блокирующие агенты также приходится использовать для предотвращения неспецифического связывания антител как с самой матрицей, так и с белковыми зонами. В данном случае в качестве блокирующих агентов используют 3%-ный БСА (Towbin et al., 1979; Aubertin et al., 1983), 10%-ную сыворотку плода коровы (Ramirez et al., 1983; De Blas et al., 1983) и 3%-ную желатину (Symington, 1984). В разных работах эти и подобные им реагенты используют в различных концентрациях. Помимо этого для предотвращения неспецифических взаимодействий антител с гидрофобными участками тех или иных белков на блоте используют разнообразные неионные детергенты, такие, как 0,05%-ный твин-20 (Symington, 1984) или 0,05%-ный NP-40 (Burnette, 1981).

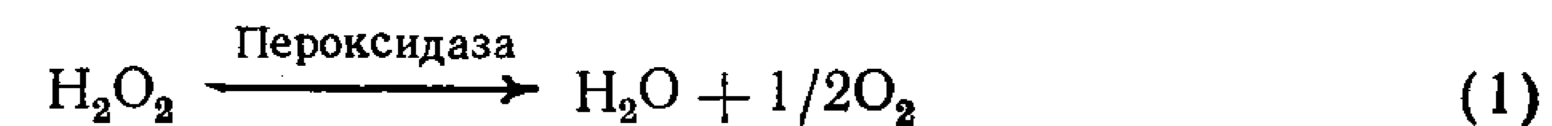
При работе с нитроцеллюлозными блотами (в отсутствие ковалентного связывания белков) их обработка, даже в случае крайне сложных неочищенных смесей исследуемых антигенов, не требует использования дополнительных белковых агентов для блокирования неспецифической сорбции (Tsang et al., 1982, 1983b, c, 1984b). Иногда белковые агенты типа БСА в действительности снижали удельную активность, не изменяя соотношения сигнала к фону при ИФА (Tsang et al., 1980). Мы считаем, что так называемые неспецифические взаимодействия по большей части обусловлены недостаточной специфичностью используемых реагентов или слишком высокой их концентрацией. Поэтому при работе с чистыми, высокоспецифичными реагентами для предотвращения гидрофобных взаимодействий мы рекомендуем использовать 0,3%-ный твин-20 и полностью отказаться от каких-либо дополнительных белковых агентов.

Другой, весьма распространенной причиной неспецифического связывания является общая тенденция к перегрузке блотов. В наших опытах при анализе даже самых сложных смесей для четкого обнаружения антигенов с помощью ИФА оказывалось вполне достаточно наносить 1 мкг суммарного белка из расчета на полоску шириной 0,5 см. В работе (Ochs, 1983) сообщалось о неспецифических взаимодействиях (артефактах), связанных с загрязнением препаратов белками кожи человека. Опасность такого загрязнения следует учитывать и по возможности избегать его, особенно при работе с высокочувствительными системами детектирования, основанными на применении антител против белков человека.

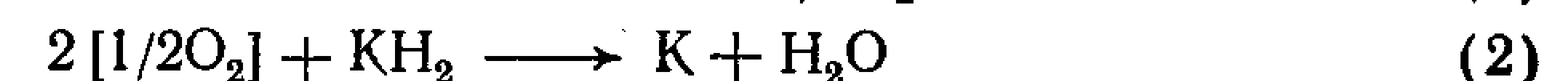
Ферментные конъюгаты и субстраты

Наиболее популярным индикаторным ферментом для ИФА является пероксидаза хрена (донор: H_2O_2-оксидоредуктаза, КФ 1.11.17). Для проявления блотов лучше использовать высокополимерные конъюгаты (Tsang et al., 1984a). Использование низкомолекулярных конъюгатов, например с молярным соотношением антитело : фермент = 1 : 1, позволяет получать линейный ответ в широком диапазоне концентраций, однако существенно ограничивает чувствительность анализа. При проявлении блотов чувствительность определения представляет больший интерес, чем линейность и возможность количественной оценки, поэтому предпочтение отдается высокомолекулярным конъюгатам.

Для визуализации пероксидазы используется следующая пара сопряженных реакций:



$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{Пероксидаза}} H_2O + 1/2O_2 \quad (1)$$



$$2\,[1/2O_2] + KH_2 \longrightarrow K + H_2O \quad (2)$$

Реакция (1), т. е. собственно ферментативная реакция, сама по себе протекает без каких-либо видимых проявлений. Визуализация достигается благодаря второй стадии — окислительному превращению красителя (К) из восстановленной формы (KH_2) в окисленную (К) *окрашенную* форму. Ясно, что выбор конкретного хромофазного красителя имеет большое значение. Для проявления блотов весьма желательно, чтобы краситель в окисленной форме становился нерастворимым, т. е. мог преципитировать на блоте непосредственно в зоне его окисления. Мы предпочитаем для этих целей использовать 3,3′-диаминобензидин (ДАБ). В работе (De Blas, Cherwinski, 1983) сообщается о применении для усиления окрашивания блотов при помощи ДАБ ионов никеля и кобальта. Используются и такие хромогенные субстраты, как 4-хлор-1-нафтол (Anderson et al., 1983; Aubertin et al., 1983) и *о*-дианизидин (Towbin et al., 1979). Другие хромогенные субстраты, часто используемые для визуализации пероксидазы: *о*-фенилендиамин, 5-аминосалициловая кислота, 2,2′-азиноди-(3-этилбензотиазолино-6-сульфоновая кислота) и 3,3′,5,5′-тетраметилбензидин, для окрашивания блотов малопригодны, поскольку после окисления они остаются раст-

воримыми. Необходимо отметить, что все перечисленные красители являются канцерогенами, вследствие чего работать с ними следует крайне осторожно.

Для проявления иммуноблотов используют и другой индикаторный фермент — щелочную фосфатазу (фосфогидролазу моноэфиров фосфорной кислоты, КФ 3.1.3.1) (Turner, 1983; O'Conner, 1982). В работе (Muilerman et al., 1982) описано также использование и визуализация фосфодиэстеразы I из печени крысы (КФ 3.1.4.1), как нативной, так и обработанной ДСН, в сочетании с двухцентровым иммуноанализом. Авторы этой работы предлагают интересные возможности ферментативного окрашивания зон после переноса (с использованием неочищенной антисыворотки против индикаторного фермента) для смесей белков, денатурированных ДСН.

Недавно было показано, что с пероксидазой в роли индикаторного фермента может весьма успешно конкурировать глюкозооксидаза. Важнейшим преимуществом этого фермента является более низкий уровень фона, чем при использовании пероксидазы (Porter, Porter, 1984). Следует добавить также, что для весьма широкого круга ферментов продемонстрирована возможность непосредственного обнаружения (окрашивания соответствующих зон) после переноса на ДЭАЭ-бумагу (McLellan, 1981).

Заключение

Методы электропереноса в сочетании с ИФА или иными методами иммунологического обнаружения зон буквально незаменимы при исследовании таких проблем, как взаимодействия в системах антиген—антитело при диагностике различных заболеваний (Sharma et al., 1983; Partanen et al., 1984), установление различных вариаций на молекулярном уровне (Hersh et al., 1984) и обнаружение специфических антигенов в различных биохимических системах (Fish et al., 1984). Замечательные успехи были достигнуты при использовании моноклональных антител и эпитопном картировании(Van Wyke et al., 1984; Dziadek et al., 1983), при доменном картировании клеточной поверхности и поиске гормональных рецепторов (Russell et al., 1984), а также в идентификации поверхностных опухолевых антигенов (Colcher et al., 1983) и локализации онкогенных продуктов (Klempnauer et al., 1984). Данный метод, особенно в сочетании с двумерным электрофоретическим фракционированием (Symington, 1984), с точки зрения разрешающей способности и чувствительности стоит вне всякой конкуренции. Привлекает его универсальность и возможность совмещения с такими методами фракционирования, как изоэлектрофокусирование (Glynn et al., 1982) и электрофорез в агарозном геле (Bittner et al., 1980), в той же мере, как с обычным ДСН-электрофорезом в ПААГ.

Весьма полезным может оказаться дальнейшее повышение чувствительности метода благодаря использованию более эффективных хромогенов, например предложенного в работе (Ngo, Lenhoff, 1980) нерастворимого красителя. Необходимо также дальнейшее систематическое изучение и оптимизация условий переноса. Сегодня практически все используемые для электропереноса условия подобраны исключительно эмпирически. Следует определить точный характер взаимосвязи между такими параметрами, как состав буфера для переноса, ионная сила, pH, напряжение и сила тока, с одной стороны, и тип и размеры переносимых молекул — с другой. От решения названных проблем зависят перспективы развития метода, который уже и сегодня можно назвать весьма совершенным.

Литература

Anderson D. J., Adams P. H., Hamilton M. S., Alexander N. J. (1983). Antisperm antibodies in mouse vasectomy sera react with embryonal teratocarcinoma, J. Immunol., **131**, 2901—2912.

Anderson N. L., Nance S. L., Pearson T. W., Anderson N. G. (1982). Specific antiserun staining of two-dimensional electrophoretic patterns of human plasma proteins immobilized on nitrocellulose, Electrophoresis, **3**, 135—142.

Aubertin A. M., Tondre L., Lopez C., Obert G., Kirn A. (1983). Sodium dodecyl sulfate-mediated transfer of electrophoretically separated DNA-binding proteins, Anal. Biochem., **131**, 127—134.

Bittner M., Kupferer P., Morris C. F. (1980). Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets, Anal. Biochem., **102**, 459—471.

Bjernum O. J., Larsen K. P., 1983. Some recent developments of the electroimmunochemical analysis of membrane proteins. Application of zwittergent, Triton X-114 and western blotting technique. In: Modern Methods in Protein Chemistry (Tschesche H., ed.). Walter de Gruyter and Co., N. Y., 74—124.

Braun D. K., Pereira L., Norrild B., Roizman B. (1983). Application of denatured, electrophoretically separated, and immobilized lysates of Herpes Simplex virus-infected cells for detection of monoclonal antibodies and for studies of the properties of viral proteins, J. Virol., **46**, 103—112.

Burnette W. N. (1981). "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A, Anal. Biochem., **112**, 195—203.

Caceres A., Binder L. I., Payne M. R., Bender P., Rebhun L., Steward O. (1984). Differential subcellular localization of tubulin and the microtubule-associated protein MAP2 in grain tissue as revealed by immunocytochemistry with monoclonal hybridoma antibodies, J. Neurosci., **4**, 394—410.

Carson S. D., Carson S. M., Konigsberg W. H. (1983). Monoclonal antibody recognizing rabbit IgG (Fab), J. Biol. Chem., **258**, 9510—9513.

Chart H., Shaw D. H., Ishiguro E. E., Trust T. J. (1984). Structural and immunochemical homogeneity of Aeromonas salmonicida lipopolysaccharide, J. Bacteriol., 158, 16—22.

Colcher D., Hand P. H., Wunderlich D., Nuti M., Teramoto Y. A., Kufe D., Schlom J. (1983). Monoclonal antibodies to human mammary carcinoma associated antigens and their potential uses for diagnosis, prognosis, and therapy. In: Immunodiagnostics Alan R. Liss, Inc., N. Y., 215—258.

Cousland G., Poxton I. R. (1983). Analysis of lipopolysaccharides of Bacteroides fragilis by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and electroblot transfer, FEMS Microbiol. Lett., **20**, 461—465.
Davis J., Bennett V. (1983). Brain Spectrin, J. Biol. Chem., **258**, 7757—7766.
De Blas A. L., Cherwinski H. M. (1983). Detection of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies, Anal. Biochem., **133**, 214.
Dziadek M., Richter H., Schachner M., Timpl R. (1983). Monoclonal antibodies used as probes for the structural organization of the central region of fibronectin, FEBS Lett., **155**, 321—325.
Erickson P. F., Minier L. N., Lasher R. S. (1982). Quantitative electrophoretic transfer of polypeptides from SDS polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: A method for their re-use in immunoautoradiographic detection of antigens, J. Immunol. Methods, **51**, 241—249.
Fish A. J., Lockwood M. C., Wong M., Price R. G. (1984). Detection of Goodpasture antigen in fractions prepared from collagenase digests of human glomerular basement membrane, Clin. Exp. Immunol., **55**, 58—66.
Flaster M. S., Schley C., Zipser B. (1983). Generating monoclonal antibodies against excised gel bands to correlate immunocytochemical and biochemical data, Brain Res., **277**, 196—199.
Fujita S. C., Zipursky S. L., Benzer S., Ferrus A., Shotwell S. L. (1982). Monoclonal antibodies against the Drosophila nervous system, PNAS, USA, **79**, 7929.
Gershoni J. M., Palade G. E. (1982). Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl-sulphate-polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter, Anal. Biochem., **124**, 396—405.
Gershoni J. M., Palade G. E. (1983). Protein blotting: Principles and applications, Anal. Biochem., **131**, 1—15.
Glass W. F. III, Briggs R. C., Hnilica L. S. (1981). Use of lectina for detection of electrophoretically separated glycoproteins transferred onto nitrocellulose sheets, Anal. Biochem., **115**, 219—224.
Glynn P., Gilbert H., Newcombe J., Cuzner M. L. (1982). Rapid analysis of immunoglobulin isoelectric focusing patterns with cellulose nitrate sheets and immunoperoxidase staining, J. Immunol. Methods, **51**, 251—257.
Goldstein M. E., Sternberger L. A., Sternberger N. H. (1983). Microheterogeneity of neurofilament proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 3101—3105.
Granger B. L., Lazarides E. (1984). Membrane sceletal protein 4.1 of avian erytrocytes is composed of multiple variants that exhibit tissue-specific expression, Cell, **37**, 595—607.
Griesser H. W., Muller-Hill B., Overath P. (1983). Characterization of β-galactosidase-lactose-permease chimaeras of E. coli, Eur. J. Biochem., **137**, 567—572.
Hancock K., Tsang V. C. W. (1983). India inc staining of proteins on nitrocellulose paper, Anal. Biochem., **133**, 157—162.
Hawkes R. (1982). Identification of concanavalin-A binding proteins after SDS-gel electrophoresis and protein blotting, Anal. Biochem., **123**, 143—146.
Hersh L. B., Wainer B. H., Andrews L. P. (1984). Multiple isoelectric and molecular weight variants of choline acetyltransferase. Artifact or real? J. Biol. Chem., **259**, 1253—1258.
Huang L. S., Jaeger J. S., Usher D. C. (1983). Allotypes associated with β-apolipoproteins in rabbits, J. Lipid Res., **24**, 1485—1493.
Irons L. E., Ashworth L. A. E., Wilton-Smith P. (1983). Heterogeneity of the filamentous haemagglutinin of Bordetella pertussis studies with monoclonal antibodies, J. Gen. Microbiol., **129**, 1769—2778.
Klempnauer K. H., Symonds G., Evan G. I., Bishop J. M. (1984). Subcellular localization of proteins encoded by oncogenes of avian myeloblastosis virus and virus E26 and by the chicken c-myb gene, Cell, **37**, 537—547.
Legocki R. P., Verna D. P. S. (1981). Multiple immunoreplica technique: screening for specific proteins with a series of different antibodies using one polyacrylamide gel, Anal. Biochem., **111**, 385—392.
Lin W., Kasamatsu H. (1983). On the electrotransfer of polypeptides from gels to nitrocellulose membranes, Anal. Biochem., **128**, 302—311.

Mandrell R. E., Zollinger W. D. (1984). Use of a zwitterionic detergent for the restoration of the antibody-binding capacity of electroblotted meningococcal outer membrane proteins, J. Immunol. Methods, **67**, 1—11.
McLellan T., Ramshaw J. A. M. (1981). Serial electrophoretic transfers: A technique for the identification of numerous enzymes from single polyacrylamide gels, Biochem. Genetics, **19**, 647—654.
Muilerman H. G., Ter Hart H. G. J., Van Dijk W. (1982). Specific detection of inactive enzyme protein after PAAG-electrophoresis by a new enzyme-immunoassay method using unspecific antiserum and partially purified active enzyme: Application to rat liver phosphodiesterase I, Anal. Biochem., **120**, 46.
Nelson W. J., Lazarides E. (1984). Goblin (ankyrin) in striated muscle: Identification of the potential membrane receptor for erythroid spectrin in muscle cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**, 3292—3296.
Ngo T. T., Lenhoff H. W. (1980). A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions, Anal. Biochem., **105**, 389.
Nielsen P. J., Manchester K. L., Towbin H., Gordon J., Thomas G. (1982). The Phosphorylation of ribosomal protein S6 in rat tissues following cycloheximide injection, in diabetes, J. Biol. Chem., **257**, 12316—12321.
Ochs D. (1983). Protein contaminants of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels, Anal. Biochem., **135**, 470—474.
O'Connor C. G., Ashman L. K. (1982). Applications of the nitrocellulose transfer technique and alkaline phosphatase conjugated anti-immunoglobulin for determination of the specificity of monoclonal antibodies to protein mixtures, J. Immunol. Methods, **54**, 267—271.
Ogata K., Arakawa M., Kasahara T., Shiori-Nakano K., Hiraoka K. (1983). Detection of Toxoplasma membrane antigens transferred from SDS-PAAG to nitrocellulose with monoclonal antibody and avidin-biotin, peroxidase anti-peroxidase and immunoperoxidase methods, J. Immunol. Methods, **65**, 75—82.
Partanen P., Turunen H. J., Paasivuo R. A., Leinikki P. O. (1984). Immunoblot analysis of Toxoplasma gondii antigens by human immunoglobulins G, M, and A antibodies at different stages of infection, J. Clin. Microbiol., **20**, 133—135.
Peppler M. S. (1984). Two physically and serologically distinct lipopolysaccharide profiles in strains of Bordetella pertussis and their phenotype variants, Infect. Immun., **43**, 224—232.
Porter D. D., Porter H. G. (1984). A glucose oxidase immunoenzymes stain for the detection of viral antigen or antibody on nitrocellulose transfer blots, J. Immunol. Methods, **72**, 1—9.
Raamsdonk W. V., Pool C. W., Heyting C. (1977). Detection of antigens and antibodies by an immuno-peroxidase method applied on thin longitudinal sections of SDS-polyacrylamide gels, J. Immunol. Methods, **17**, 337—348.
Ramirez P., Bonilla J. A., Moreno E., Leon P. (1983). Electrophoretic transfer of viral proteins to nitrocellulose sheets and detection with peroxidase-bound lectins and protein A, J. Immunol. Methods, **62**, 15—22.
Reiser J., Wardale J. (1981). Immunological detection of specific proteins on total cell extracts by fractionation on gels and transfer to diazophenylthioether paper, Eur. J. Biochem., **114**, 569—575.
Renart J., Reiser J., Stark G. R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobensyloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 3116—3120.
Russell D. W., Schneider W. J., Yamamoto T., Luskey K. L., Brown M. S., Goldstein J. L. (1984). Domain map of the LDL receptor: Sequence homology with the epidermal growth factor precursor, Cell, **37**, 577—585.
Schott K. J., Neuhoff V., Nessel B., Potter U., Schroter J. (1984). Staining of concanavalin A. Reactive glycoproteins on polyacrylamide gels with horseradish peroxidase — A critical evaluation, Electrophoresis, **5**, 77—83.
Sharma S. D., Mullenax J., Araujo F. G., Erlich H. A., Remington J. S. (1983). Western blot analysis of the antigens of Toxoplasma gondii recognized by

human IgM and IgG antibodies, J. Immunol., **131**, 977—983.
Southern E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, J. Mol. Biol., **98**, 503—517.
Stefansson K., Marton L., Antel J. P., Wollmann R. L., Roos R. P., Chejfec G., Arnason B. G. W. (1983). Neuropathy accompanying IgM monoclonal gamopathy, Acta Neuropathol., **59**, 255—261.
Steinemann C., Fenner M., Binz H., Parish R. W. (1984). Invasive behavior of mouse sarcoma cells is inhibited by blocking a 37,000 — dalton plasma membrane glycoprotein with Fab fragments, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**, 3747—3750.
Sutton R., Wrigley C. W., Baldo B. A. (1982). Detection of IgE- and IgG-binding proteins after electrophoretic transfer from polyacrylamide gels, J. Immunol. Methods, **52**, 183—194.
Symington J., 1984. Electrophoretic transfer of proteins from two-dimensional gels to sheets and their detection. In: Two-dimensional gel electrophoresis of proteins: Methods and applications (Celis J. E. and R. Bravo, eds.), Academic Press, New York.
Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 4350—4354.
Towbin H., Gordon J. (1984). Immunoblotting and dot immunobinding — current status and outlook, J. Immunol. Methods, **72**, 313—340.
Tsang V. C. W., Wilson B. C., Maddison S. E. (1980). Kinetic studies of a quantitative single-tube enzyme-linked immunosorbent assay, Clin. Chem., **26**, 1255—1260.
Tsang V. C. W., Tao Y., Qui L., Xue H. (1982). Fractionation and quantitation of egg antigens from Schistosoma japonicum by the single-tube kinetic-dependent enzyme-linked immunosorbent assay (k-ELISA): Higher antigen activity in urea-soluble than in aqueous-soluble fractions, J. Parasitol., **68**, 1034—1043.
Tsang V. C. W., Peralta J. M., Simons A. R. (1983a). Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis, Methods, Enzymol., **92**, 377—391.
Tsang V. C. W., Tsang K. R., Hancock K., Kelly M. A., Wilson B. C., Maddison S. E. (1983b). Schistosoma mansoni adult microsomal antigens, a serological reagent. I. Systematic fractionation, quantitation, and characterization of antigenic components, J. Immunol., **130**, 1359—1365.
Tsang V. C. W., Hancock K., Kelly M. A., Wilson B. C., Maddison S. E. (1983c). Schistosoma mansoni adult microsomal antigens, a serological reagent. II. Specificity of antibody responses to the S. mansoni microsomal antigen (MAMA), J. Immunol., **130**, 1366—1370.
Tsang V. C. W., Hancock K., Maddison S. E. (1984a). Quantitative capacities of glutaraldehyde and sodium m-periodate coupled peroxidase-anti-human IgG conjugates in enzyme-linked immunoassays, J. Immunol., Methods, **70**, 91—100.
Tsang V. C. W., Hancock K., Maddison S. E., Beatty A. L., Moss D. M. (1984b). Demonstration of species-specific and cross-reactive components of the adult microsomal antigens from Schistosoma mansoni and S. japonicum (MAMA and JAMA), J. Immunol., **132**, 2607—2613.
Tsang V. C. W., Hancock K., Simons A. R. (1985). Calibration of prestained protein molecular weight standards for use in the "Western" or enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques, Anal. Biochem., **143** (in press).
Turner B. M. (1983). The use of alkaline-phosphate-conjugated second antibody for the visualization of electrophoretically separated proteins recognized by monoclonal antibodies, J. Immunol. Methods, **63**, 1—6.
Van Wyke K. L., Yewdell J. W., Reck L. J., Murphy B. R. (1984). Antigenic characterization of influenza A virus matrix protein with monoclonal antibodies, J. Virol., **49**, 248—252.

Глава 23

Иммуноферментная диагностика тропических заболеваний, вызываемых паразитами

Д. де Савиньи, Ф. Спейсер

Введение

В иммунодиагностике тропических заболеваний достигнуты значительные успехи благодаря вкладу в ее развитие последних достижений в таких областях, как культивирование патогенных паразитов *in vitro*; внедрение новых методов получения и очистки иммунодиагностических реагентов; использование в качестве диагностических реагентов моноклональных антител и разработка чувствительных методов иммуноанализа, позволяющих обнаруживать незначительные количества патогенов или их маркеров в физиологических жидкостях.

Однако по-прежнему эти методы, как правило, не выходят за рамки исследовательских лабораторий, и лишь немногие из них нашли практическое применение там, где они нужнее всего, т. е. непосредственно в тропиках. Необходимость развития эффективной иммунодиагностики тропических заболеваний, вызываемых паразитами, и особые проблемы, возникающие в связи с внедрением такой диагностики в тропических условиях, рассмотрены в обзоре (Voller, de Savigny, 1981).

В настоящее время иммунодиагностика *in vitro* тропических инфекций развивается по двум главным направлениям, основанным на 1) обнаружении циркулирующих антител и 2) обнаружении циркулирующих или экскретируемых антигенов.

Первый подход, связанный с обнаружением антител, является вполне традиционным. Однако для эффективных и чувствительных новых методов иммуноанализа качество антигенов, доступных для тестирования антител, оказывается уже неудовлетворительным. Анализы этого типа недостаточно специфичны из-за отсутствия очищенных препаратов соответствующих антигенов. В связи с этим серология заболеваний, вызываемых паразитами, не дает достаточных возможностей в области их диагностики. Более того, сам принцип обнаружения антител, даже при использовании качественных препаратов патоген-специфических антигенов, характеризуется невысокими предсказательными возможностями. В начальной стадии инфекции или при ее протекании в легкой форме уровень антител может быть ниже предела чувствительности обнаружения, что порождает ложные отрицательные ответы. И наоборот, в некоторых случаях специфические антитела сохраняются в кровотоке на заметном уровне даже спустя несколько лет после выздоровления

(спонтанного или последовавшего за курсом лечения), из-за чего при проведении иммуноанализа могут быть получены ложные положительные ответы. У многих групп населения тропиков из-за многократных повторных инвазий распространенность антител соответствующей специфичности может быть настолько велика, что релевантность иммуноанализа, основанного на регистрации иммунного ответа, оказывается крайне низкой. В отличие от методов обнаружения антигенов количественное определение антител, строго говоря, вообще невозможно, поскольку на результатах гетерогенного иммуноанализа сказывается не только количественное содержание, но и аффинность антител (Butler et al., 1978). Анализ, основанный на обнаружении антител, в лучшем случае можно рассматривать как метод предварительной лабораторной диагностики.

Другой подход, связанный с регистрацией специфических циркулирующих или экскретируемых антигенов в физиологических жидкостях больных с помощью иммуноанализа, привлекает к себе все больше внимания. Этот метод позволяет свести к минимуму названные ограничения в предсказании диагноза и достоверно поставить его без привлечения опытных, квалифицированных паразитологов и микроскопистов.

Методы иммуноанализа при обнаружении как антител, так и антигенов обеспечивают быстрый и эффективный анализ множества образцов с использованием весьма несложных экспериментальных приемов. В настоящей главе рассмотрены возможности применения обоих названных подходов при ИФА антител и антигенов для диагностики тропических заболеваний, вызываемых паразитами.

Часть А. Иммуноферментный анализ антител

На сегодняшний день высокоспецифичные препараты антигенов паразитов, необходимые для иммунодиагностики, практически недоступны. Поэтому надежность тестирования данного образца сыворотки с использованием единичного малоспецифичного антигенного препарата весьма ограничена. Однако при проведении серии серологических тестов на каждом образце с использованием широкого набора различных антигенов можно при наличии определенного опыта рассчитывать на более или менее достоверную интерпретацию полученных результатов. Относительно более высокая надежность такой интерпретации, а следовательно, увеличение предсказательных возможностей и повышение надежности диагноза обусловлены возможностью сопоставления интенсивности различных специфических и неспецифических ответов в серии тестов. Данный подход оказывается экономически и технически вполне доступным благодаря высокой эффективности и экономичности современных вариантов непрямого гетерогенного иммуноферментного анализа (ELISA). В течение нескольких последних лет в Швейцарском институте тропических заболеваний нами был разработан и предложен к внедрению быстрый мультиантигенный вариант метода ELISA, дающий удовлетворительные результаты тестирования, несмотря на то что большинство антигенов, соответствующих различным заболеваниям, были представлены в серии в виде дешевых неочищенных препаратов.

Методы

Быстрый мультиантигенный вариант метода ELISA для скрининга препаратов антител

Получение антигенов. Мы работали с неочищенными экстрактами, содержащими искомые антигены. Использовали следующие культуры простейших: *Leishmania donovani* (штамм 1S Sudan), *Trypanosoma gambiense* (EATRO 210) и *Trypanosoma cruzi* (штамм Y). Клетки разрушали в 0,06 М карбонатном буфере, pH 9,6, пятикратным повторением цикла замораживание (в смеси сухой лед/петролейный эфир) — оттаивание (в водяной бане при 37 °С). Для определения амебной инвазии использовали смесь водорастворимых антигенов *Entamoeba histolytica* (штамм HK9). Для получения антигенных препаратов гельминтов (*Dipetalonema viteae, Fasciola hepatica, Schistosoma mansoni* и *Schistosoma haematobium*) готовили экстракты из зрелых особей, размельчая их в стеклянном гомогенизаторе и экстрагируя при 4 °С в течение 24 ч 0,13 М фосфатно-солевым буфером, pH 7,2. Для диагностики токсокариоза использовали антигенные метаболиты из супернатанта второй стадии развития культуры *Toxocara canis* (de Savigny, 1975). Препараты антигенов эхинококка из жидкости, содержащейся в цистах *E. granulosis,* получали центрифугированием 15 мин при 200 g с последующим диализом (в течение ночи) против карбонатного буфера, pH 9,6. Перед использованием все препараты антигенов подвергали ультрацентрифугированию при 100 000 g (2 ч при 4 °С).

Методика ELISA. Все препараты антигенов разводят до удобной для анализа концентрации (~1 мкг/мл) карбонатно-солевым буфером, pH 9,6, и вносят по 200 мкл в лунки платы для микротитрования (каждому препарату соответствует один ряд лунок по горизонтали). Платы (типа Dynatech 29B или Petraplast 1.011) закрывают крышками, инкубируют 2 дня при 4 °С и используют в течение последующих 3 нед. Перед анализом промывают платы 0,15%-ным раствором твина-20 (Merck, 822184). Препараты сыворотки больных разводят 1 : 160 в фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,05% твина-20 (раствор

ФСБ-Т), и разливают по 200 мкл в лунки платы (каждому препарату сыворотки соответствует ряд лунок по вертикали) таким образом, чтобы каждая сыворотка тестировалась с восемью различными антигенами. Инкубируют 15 мин при 37 °С. Затем удаляют растворы из лунок, заполняют их нагретым до 37 °С раствором ФСБ-Т, инкубируют 5 мин при 37 °С, промывают 0,15%-ным раствором твина-20. В каждую лунку добавляют раствор ферментного конъюгата (на основе козьих антител против IgG человека, разведенный ФСБ-Т в 1500 раз) и инкубируют 15 мин при 37 °С. Промывают так же, как и на предыдущей стадии, добавляя промывку водой, и затем обрабатывают раствором, содержащим субстрат (0,03% H_2O_2) и хромоген (0,1% *о*-фенилендиамина) на основе 0,07 М ФСБ, рН 5,0. Реакцию останавливают добавлением 8 н. серной кислоты (50 мкл/лунку), контролируя время инкубации по развитию окраски в положительном и отрицательном контролях. При проведении рутинных диагностических тестов в качестве внутренних стандартов сравнения для всей мультиантигенной платы использовали амебные антигены. Измеряют поглощение при 492 нм. Содержимое лунок с оптической плотностью выше 2,0 разводят 1 : 5 раствором субстрата в смеси с кислотой и после этого снова измеряют A_{492}.

Типичные результаты

Использование быстрого мультиантигенного варианта ELISA для тестирования антител

При титровании различных препаратов сыворотки данным методом с использованием различных периодов инкубации (15, 30 и 120 мин) при 37 °С для каждой системы антиген—антитело выявляется семейство параллельных кривых (рис. 23-1). Поскольку в случае антигенов *Echinococcus granulosus* фоновое окрашивание, как правило, проявляется в большей степени, чем для антигенных препаратов других гельминтов, показанная серия отрицательных контролей соответствует взаимодействию именно этого антигена с нормальной (отрицательной) сывороткой. Различия в характере зависимости оптической плотности от времени инкубации в разных системах антиген — антитело не превышают 50%. Выход значений A_{492} на плато наблюдается только в случае антигенов *Toxocara*. При 15-минутной инкубации коэффициенты вариации для всех разведений сыворотки, меньших чем 1 : 10 000, не превышают 15%. При повышении степени разведения сыворотки значения коэффициентов вариации обычно возрастают. Это наблюдалось для всех систем антиген—антитело независимо от времени инкубации.

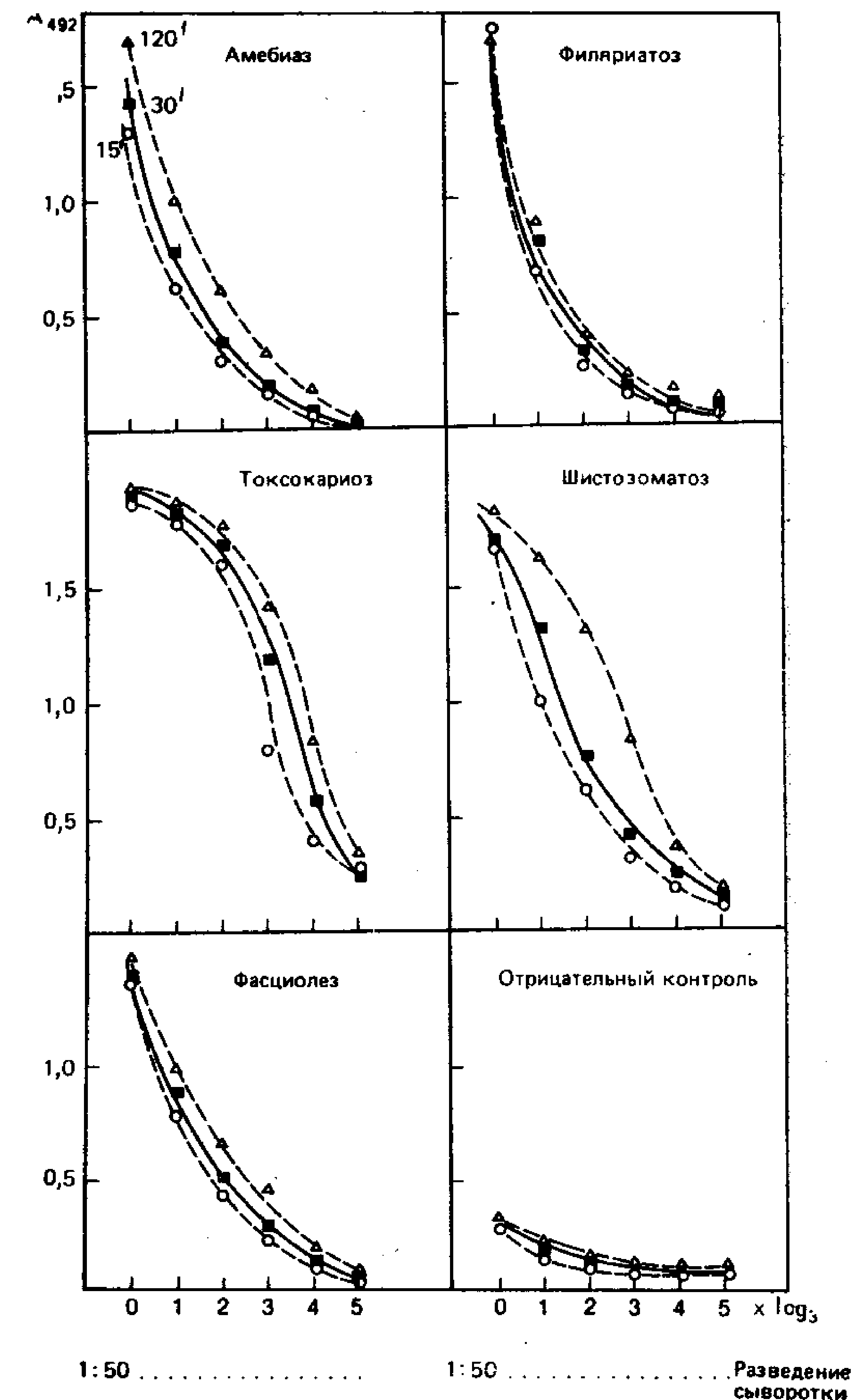


Рис. 23-1. Кривые титрования сыворотки при различных временах инкубации с сывороткой в мультиантигенном варианте метода ELISA. Представленные результаты отражают средние значения для 8 тестов.

Кривые титрования конъюгата (при различных временах инкубации — 15, 30 и 120 мин и температуре 37 °С), полученные методом ELISA с использованием иммобилизованных на носителе IgG, представлены на рис. 23-2. Участков «плато» на них не наблюдается. То же имеет место и при титровании в мультиантигенной системе. Различия между значениями поглощения, соответствующими различным временам инкубации, не превышают 50% как для прямых, так и для непрямых вариантов тестирования. Эти различия можно легко свести к минимуму, осуществляя непрерывный контроль изменения поглощения в ходе инкубации с субстратом. Сама ферментативная реакция протекает по линейному закону и с очень большой скоростью (0,25 опт. ед./мин). Она практически полностью завершается за 1—2 мин. Более длительные периоды инкубации на послед-

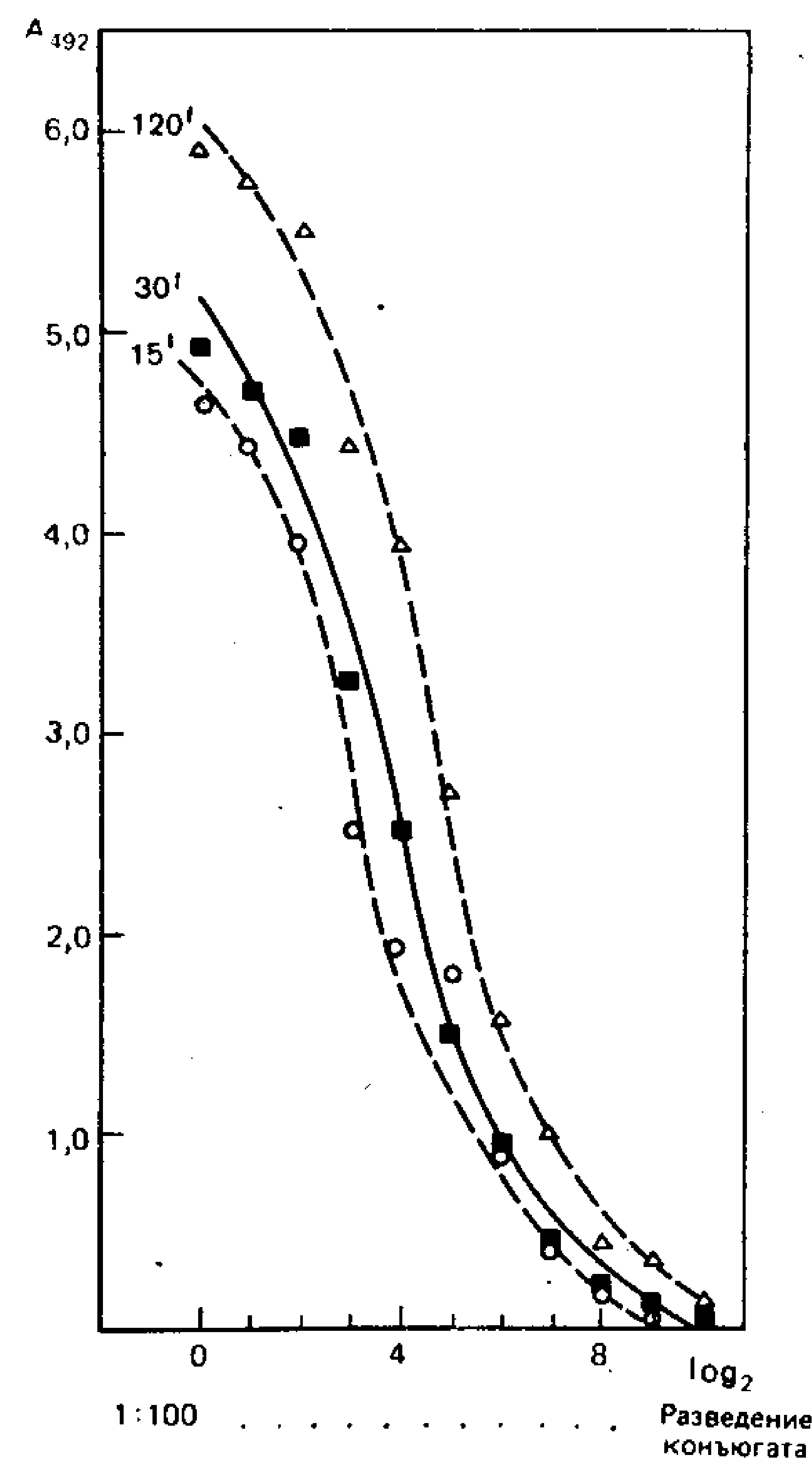


Рис. 23-2. Кривые титрования конъюгата, полученные прямым методом ELISA с использованием иммобилизованных на носителе IgG.

нем этапе используют для приближения значений поглощения в случае 15-минутной инкубации в системе сыворотка/конъюгат к значениям, наблюдаемым после 2-часовой инкубации.

На рис. 23-3 отражены данные по варьированию наблюдаемых значений (как внутри одной серии, так и между различными сериями анализов), собранные за 2-месячный период широкомасштабного тестирования множества антигенов гельминтов на платах с помощью ELISA. Для всех кривых наблюдаются сходные значения отклонений, за исключением системы тестирования токсокариоза. Как оказалось, это было связано с методическими погрешностями, допущенными при создании покрытия плат антигенами (в конце февраля). На рис. 23-3 приведены также значения отклонений внутри одной серии тестов (т. е. при сравнении внутри серии результатов микротитрования на различных платах) на антигены *Schistosoma*. Лишь в 4 из 22 случаев отклонение превышало 10% (16, 12, 14 и 14%). Для других систем антиген—антитело в рамках тестирования на мультиантигенных платах наблюдались аналогичные значения отклонения. Отклонения при сравнении различных серий тестирования, выраженные в форме коэффициентов вариации (*V*), составляли: 8,2% — для шистозоматоза; 6,9% — для филяриатоза; 8% — для эхинококкоза и 15,5% — для токсокариоза. Основным источником возникновения такого рода отклонений является стадия взаимодействия фермента с хромогенным субстратом. Поскольку на этой стадии используется раствор с заведомо избыточной концентрацией соответствующих компонентов, ферментативная реакция может протекать быстро и по линейному закону. Для получения высококачественных результатов желательно следить за протеканием реакции во времени.

При анализе с помощью мультиантигенного варианта ELISA

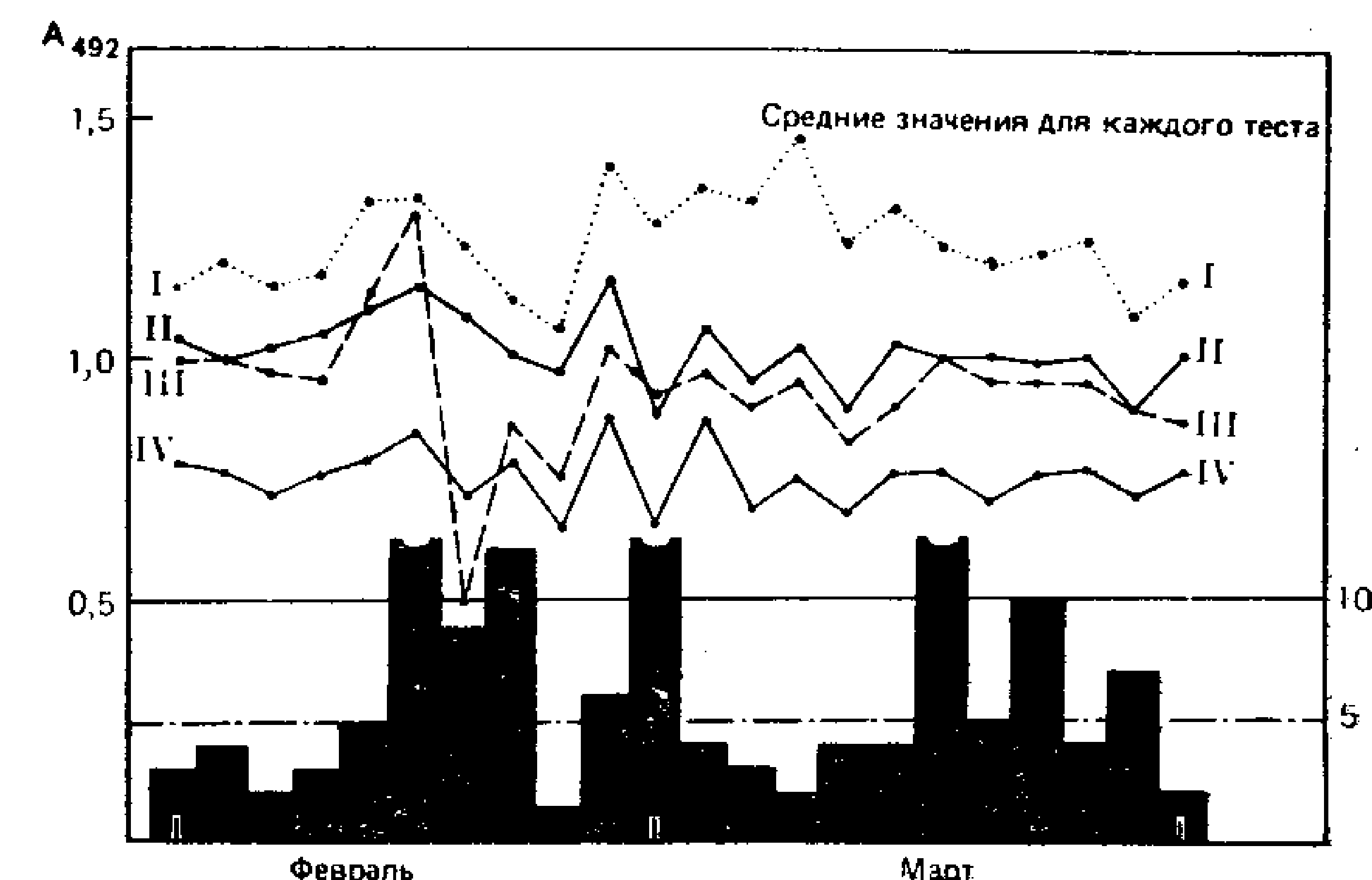


Рис. 23-3. Воспроизводимость гомологичных контрольных реакций в мультиантигенном варианте метода ELISA на протяжении двух месяцев рутинного использования для проведения анализов в серодиагностической лаборатории. Закрашенная черным гистограмма отражает максимальное и минимальное отклонения (в процентах на правой оси ординат) для одной системы (шистозоматоз). Кривые соответствуют системам определения: *I* — шистозоматоз; *II* — филяриатоз; *III* — токсокариоз; *IV* — эхинококкоз.

образцов сыворотки больных с различными инфекционными заболеваниями (при паразитологически подтвержденном диагнозе) было показано, что наиболее высокие значения поглощения проявляются именно в гомологичной системе взаимодействий антиген—антитело. Наблюдаемые при этом различия между поглощением в гомологичной системе и в системе с перекрестно реагирующими компонентами иногда оказывались невелики, но всегда хорошо воспроизводимы. В случае инвазий, вызываемых гельминтами, может наблюдаться «одностороннее» перекрестное взаимодействие. Так, образцы сыворотки при инвазии *Fasciola* дают интенсивную перекрестную реакцию с антигенами *Dipetalonema viteae* и *Echinococcus granulosus* (рис. 23-4). В то же время сыворотка больных с инвазией *Filaria* и *Echinococcus* не реагирует с антигенами *Fasciola hepatica* (рис. 23-5). Лишь для одного из 44 больных с паразитологически подтвержденной инвазией *Schistosoma, Filaria* или *Echinococcus*, в сыворотке которых в высоком титре содержались антитела против соответствующих антигенов, наблюдалась также перекрестная реакция с антигенами *F. hepatica* (результаты не показаны). Таким образом, частота, с которой в мультиантигенном варианте метода ELISA проявляются перекрестные реакции, в значительной степени зависит от конкретного типа инвазии.

Это подтверждает и анализ данных, полученных при использовании метода в течение 1 года для выявления паразитарной инвазии гельминтов (проанализировано 3400 образцов сыворотки) (рис. 23-5). Из 24 образцов сыворотки, содержащих антитела против *F. hepatica*, в 75% случаев наблюдалось также взаимодействие с двумя другими антигенами (в основном *D. viteae* и *E. granulosus*). Среди образцов сыворотки, реагиру-

ющих с антигенами D. viteae (всего 334 образца), 60% давали реакцию с каким-либо другим антигеном (как правило, с антигенами *E. granulosus*) и 80% из 224 образцов сыворотки, реагирующих с антигенами *E. granulosus*, также взаимодействовали с антигенами других возбудителей инвазии (в основном с антигенами *D. viteae*). Для этих образцов сыворотки взаимодействие с двумя дополнительными антигенами менее характерно, чем для образцов сыворотки, специфичной к *F. hepatica*. При анализе в системах выявления инвазий *Toxocara* или *Schistosoma* множественность взаимодействий проявляется в значительно меньшей степени.

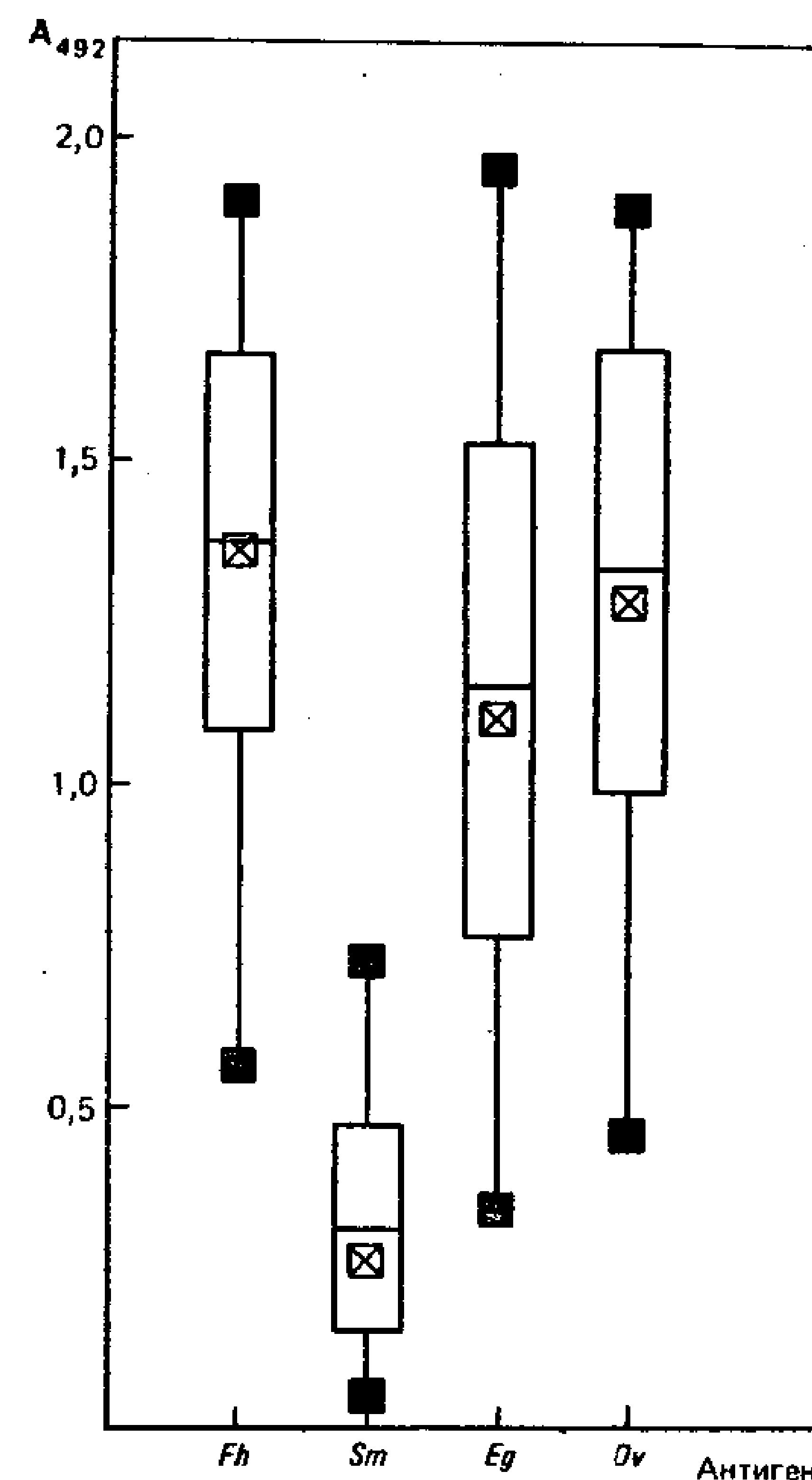


Рис. 23-4. Сравнение значений поглощения в мультиантигенном варианте метода ELISA для 49 образцов сыворотки больных с установленным фасциолезом. Колонки отражают средние и стандартные отклонения: темные квадраты отмечают экстремальные значения, а светлые — средние значения. Использованы следующие обозначения: *Fh* — для *F. hepatica*, *Sm* — для *S. mansoni*, *Eg* — для *E. granulosus*, *Dv* — для *D. viteae*.

Обсуждение

Быстрый мультиантигенный вариант метода ELISA, используемый для скрининга антител

Технические аспекты. В литературе описаны различные варианты быстрого проведения скрининга антител с помощью ELISA (Saunders et al., 1978). Быстрые методы позволяют расширить возможности аналитической лаборатории и повысить надежность серологической диагностики за счет сравнительного анализа результатов множественных тестов без привлечения к работе дополнительного персонала. Использование подобных быстрых вариантов метода ELISA особенно эффективно при серологической диагностике таких заболеваний, для которых характерно проявление перекрестных реакций. В то же время системы быстрого серологического скрининга, как правило, позволяют получать лишь качественные результаты. Для количественного определения специфических антител необходимо, чтобы при проведении анализа единственным лимитирующим фактором являлась их антигенная активность (Tsang et al., 1980). В опытах по титрованию конъюгата при инкубации в течение 15, 30, 120 мин и даже по прошествии 24 ч

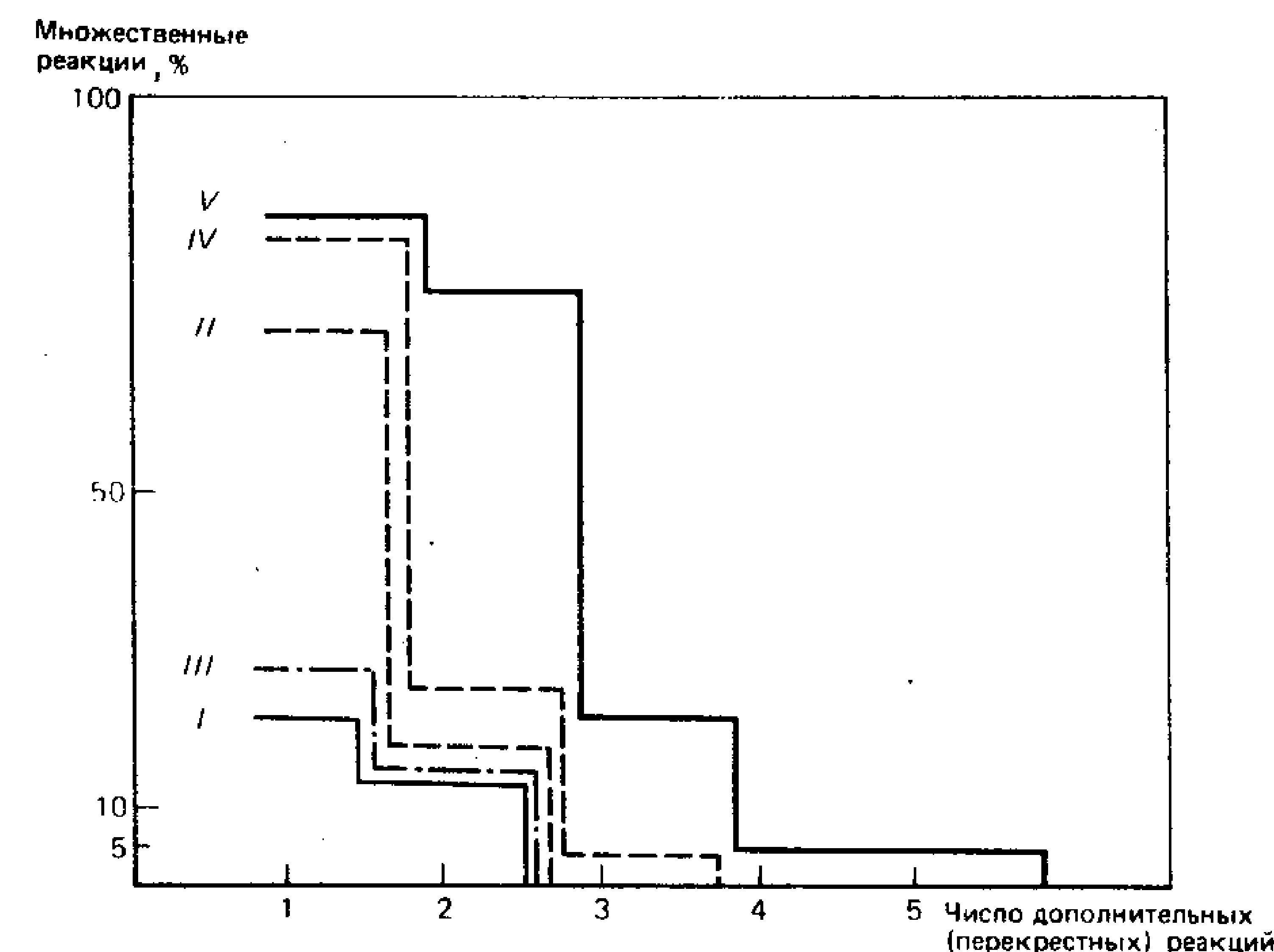


Рис. 23-5. Сопоставление данных, отражающих частоту проявления множественных положительных реакций образцов сыворотки с различными антигенами гельминтов при использовании в течение 1 года мультиантигенного варианта метода ELISA. Всего проанализировано 3400 образцов сыворотки. Обозначения см. рис. 23-3.

выхода значений поглощения на плато не наблюдалось. Такая же картина характерна для препаратов конъюгированных антител, полученных из самых разных источников. Таким образом, наиболее выгодным (в экономическом отношении) компромиссом оказывается подбор оптимального рабочего разведения конъюгата, обеспечивающего проведение полуколичественного анализа.

Мы нашли, что концентрация компонентов системы гораздо сильнее влияет на конечное значение поглощения, чем время инкубации. Начальная стадия связывания антител протекает очень быстро. Так, при инкубации с сывороткой в течение 1 мин (20 °C) поглощение достигает 15% значения, получаемого на конечном этапе анализа при 15-минутной инкубации (37 °C) с тем же препаратом сыворотки. Проявление такой высокой начальной скорости связывания можно объяснить, исходя из закона действующих масс, в соответствии с которым скорость связывания в начальной стадии реакции до достижения равновесия должна быть велика по сравнению со скоростью обратной реакции (Maggio, 1981). Использование непродолжительного периода инкубации может способствовать повышению специфичности тестирования, поскольку именно наиболее авидные анти-

тела должны связываться в первую очередь. Как отмечается в работе (Lethonen, Eerola, 1982), преимущественному связыванию наиболее авидных антител должно способствовать и использование более концентрированных препаратов сыворотки. Названные факторы придают быстрым вариантам метода ELISA бóльшую избирательность по сравнению с традиционными вариантами, включающими длительные периоды инкубации, что важно для систем с перекрестными взаимодействиями. Такие перекрестные взаимодействия часто наблюдаются в случае серологического тестирования заболеваний, вызываемых паразитами, особенно при использовании в анализе неочищенных антигенных препаратов.

Другим фактором, существенно влияющим на результаты тестирования, является состав раствора, содержащего субстрат и индикаторный краситель. Для создания количественной тест-системы необходимым условием является линейный характер ферментативной реакции превращения субстрата. Линейность может быть достигнута при высоких концентрациях субстрата. В этих условиях увеличивается и скорость превращения субстрата. Недостатком такого подхода является необходимость контролировать протекание ферментативной реакции во времени. За счет использования кратких периодов инкубации с субстратом удавалось постоянно работать в режиме линейности ферментативных реакций и, таким образом, получать более точные результаты. Представленный в настоящей работе вариант метода ELISA по своим характеристикам близок к так называемому кинетическому варианту [метод K-ELISA, описанный (Tsang et al., 1980; 1981)], в котором результаты выражают величиной наклона прямой в первые 2 мин на стадии инкубации с субстратом (ΔA_{460}/мин).

Коэффициенты вариации анализов в рамках одной серии (на различных платах для микротитрования) близки к наблюдаемым при сравнении результатов различных серий. Таким образом, важно сравнивать взаимодействия сыворотки с несколькими различными антигенами на одной плате. Это особенно существенно в тех случаях, когда различия между поглощениями, наблюдаемыми в гомологичной системе и в системе с перекрестными взаимодействиями антиген—антитело, недостаточно велики. При рутинном использовании данной методики ELISA различия между результатами повторных анализов составляли около 5%. Воспроизводимость рассматриваемого мультиантигенного варианта метода ELISA характеризуется величиной коэффициента вариации в диапазоне 5—19%. При увеличении степени разведения сыворотки независимо от времени инкубации воспроизводимость анализа ухудшается. Это является еще одним аргументом в пользу применения достаточно концентрированных препаратов сыворотки. Более высокий уровень фонового окрашивания, наблюдаемый при использовании более концентрированных препаратов сыворотки, можно снизить, увеличивая концентрацию твина-20 в буфере для разведения или вводя дополнительную отмывку этим буфером при 37 °С.

Серодиагностические аспекты. В ходе использования быстрого мультиантигенного варианта метода ELISA в постоянной практике серодиагностической лаборатории было установлено, что перекрестные реакции проявляются не только при инвазиях филогенетически родственными видами паразитов, но и при инвазионных заболеваниях с совершенно различной этиологией (например, при инвазиях *Filaria* и *Echinococcus*; Speiser, 1980). Все же при мультиантигенном тестировании в серии антигенов гельминтов образцы сыворотки больных, зараженных *Echinococcus granulosus*, всегда дают наиболее сильную реакцию с гомологичным антигенным препаратом (Speiser, 1982).

Все образцы сыворотки, реагирующие с *F. hepatica*, обнаруживают также сильное перекрестное взаимодействие с антигенами *D. viteae* и *E. granulosus*. Перекрестное взаимодействие с антигенами *S. mansoni* проявляется значительно реже и с меньшей интенсивностью. Для образцов сыворотки больного, инфицированного данным возбудителем, часто оказывается характерен определенный набор «однонаправленных» взаимодействий. Специфичность такого набора была подтверждена в работах нашей лаборатории с образцами сыворотки мышей, инвазированных *S. mansoni* или *F. hepatica*.

Для некоторых систем взаимодействия антиген—антитело, напротив, характерна высокая специфичность. Так, в целом ряде работ описано использование в методе ELISA специфических метаболических антигенов второй стадии развития личинок *Toxocara canis* (de Savigny et al., 1979; Carlier et al., 1982; Matsumara, Endo, 1982; Van Knapen et al., 1983). Согласно результатам, полученным при рутинном тестировании методом ELISA, образцы сыворотки больных с предполагаемой инвазией *Toxocara* крайне редко дают перекрестные реакции с антигенами других гельминтов. Таким образом, иммунный ответ, развивающийся у больных токсокариозом, вырабатывается в основном именно к этим совершенно особым метаболическим антигенам, обнаруживаемым и *in vivo*, и *in vitro*. Это означает, что выявление инвазии *Toxocara* методом ELISA должно занять соответствующее место в ряду стандартных методов серологического тестирования гельминтов (Speiser, Gottstein, 1984).

Рассмотрение совокупности результатов, которые удается получить в рамках мультиантигенного варианта метода ELISA (включая величины поглощения, частоту и характерный профиль перекрестных взаимодействий), повышает эффективность и предсказательные возможности серодиагностики по сравнению с анализом в рамках единичной системы взаимодействий анти-

ген—антитело. Так, при интенсивном взаимодействии сыворотки с антигенами *T. canis* и *D. viteae* весьма вероятна двойная инвазия *Toxocara* и *Filaria* (или другими гельминтами). Взаимодействие сыворотки с антигенами *F. hepatica, D. viteae* и *E. granulosus* является серьезным указанием на возможность печеночного фасциолеза (или легочной инвазии *Paragonimus westermanii*). Если взаимодействие ограничивается только антигенами *F. hepatica,* то следует учитывать возможность неспецифических взаимодействий (которые в отличие от перекрестных взаимодействий характеризуются отсутствием какой-либо избирательности). Если сыворотка реагирует со всеми препаратами антигенов гельминтов, стоит рассмотреть возможные причины проявления неспецифических взаимодействий.

Представленный в настоящей работе вариант метода ELISA характеризуется высокой диагностической эффективностью. С его помощью два лаборанта могут за один день протестировать до 700 образцов сыворотки по четырем различным антигенам. Использование этого метода позволяет лаборатории, проводящей массовое серодиагностическое тестирование, обеспечивать клинику анализами, более полно и достоверно отражающими картину инфекции. В то же время для дальнейшего развития методов мультиантигенного тестирования необходимо внедрение очищенных высокоспецифичных препаратов антигенов. Получение таких препаратов описано в литературе, однако они до сих пор еще экономически недоступны для рутинного использования. В связи с этим более реалистичными представляются перспективы разработки методов получения частично очищенных препаратов, которые по сравнению с неочищенными экстрактами позволили бы повысить избирательность метода в отношении гомологичных и перекрестных взаимодействий антиген—антитело. Использование таких частично очищенных антигенов могло бы обеспечить бóльшие селективность и предсказательные возможности серодиагностики заболеваний, вызываемых паразитами.

Часть Б. Иммуноферментный анализ паразитарных антигенов

О некоторых преимуществах подхода к диагностике инвазионных заболеваний, основанного на обнаружении антигенов, уже шла речь во вводной части настоящей статьи. Амебная инвазия является весьма распространенным и потенциально опасным заболеванием, характерным для жителей тропиков и путешественников, побывавших в некоторых из развивающихся стран. В связи с этим амебные инвазии привлекли внимание специалистов в области диагностики. Для надежной постановки диагноза на сегодняшний день необходимо приготовление и тщательное микроскопическое исследование многочисленных образцов экскрементов, которое должны проводить опытные и высококвалифицированные работники. Такой анализ является крайне неэкономичным, что и послужило дополнительным стимулом к разработке более быстрого, простого и дешевого метода непрямого ИФА, позволяющего обнаруживать искомые патогены — *Entamoeba histolytica* в образцах экскрементов. Мы приведем описание модифицированного варианта разработанного недавно метода (Grundy et al., 1985), позволяющего с помощью непрямого ИФА обнаруживать в фекальных экстрактах как трофозоиты, так и цисты.

Методы

Методы ELISA для определения антигенов *E. histolytica*

Антиген. Готовили чистую культуру *E. histolytica* шт. НК9, как описано (Diamond, 1968). Собирали биомассу через 96 ч центрифугированием при 4 °С. Осадок промывали 3 раза при 4 °С и разрушали клетки обработкой ультразвуком в ледяной бане (3×1 мин).

Иммуносорбенты. К 3 г BrCN-активированной сефарозы 4В (Pharmacia) добавляли 20 мл 50%-ного раствора термоинактивированной овечьей сыворотки. 10 г BrCN-активированной сефарозы обрабатывали 60 мл гомогената *E. histolytica,* содержащего 2 мг/мл белковых компонентов. К 3 г BrCN-сефарозы добавляли 20 мл 20%-ной кроличьей антисыворотки против бычьих иммуноглобулинов (Dako).

Овечьи иммуноглобулины против антигенов E. histolytica. Гомогенат *E. histolytica*, полученный как описано выше, суспендировали в концентрации 8 мг/мл в расчете на сырой вес в ФСБ, содержащем 0,1% тритона Х-100. Суспензию пропускали через колонку с иммуносорбентом — иммобилизованной кроличьей антисывороткой против бычьих иммуноглобулинов, собирали фракции при скорости потока 10 мл/ч при 4 °С. Иммунизировали овцу 2 мл фракции, которая содержит компоненты, не связавшиеся с колонкой, при концентрации 2,5 мг/мл в полном адъюванте Фрейнда подкожно на 1-, 6-, 13-, 20- и 34-й день. Кровь отбирали на 41-й день. Сыворотку пропускали через колонку с иммобилизованными белками *E. histolytica* со скоростью 10 мл/ч при 4 °С. При промывании элюировали специфические антитела 0,1 М буфером глицин-HCl, pH 2,4. Доводили pH в элюате до 8,0 буфером трис-HC и диализовали ночь при 4 °С против раствора ФСБ, 0,02% NaN_3. Хранили при 4 °С.

Кроличьи иммуноглобулины против антигенов E. histolytica. Двух новозеландских белых кроликов иммунизировали препа-

ратом, содержащим 10^6 трофозоитов *E. histolytica*, внутрибрюшинно на 1-, 14- и 21-й день. Кровь отбирали на 28-й день. Сыворотку пропускали через колонку с иммобилизованными белками *E. histolytica* со скоростью 10 мл/ч при 4 °С, промывали, элюировали и диализовали, как описано выше. Пропускали очищенные иммуноглобулины через колонку с иммобилизованной овечьей нормальной сывороткой, собирали фракцию, которая содержит компоненты, не связавшиеся с колонкой, и хранили ее при 4 °С.

Конъюгат овечьих антител против F_C-фрагментов иммуноглобулинов кролика с пероксидазой. Конъюгирование овечьих антител против F_C-фрагментов кролика (Dako) с пероксидазой (Sigma, тип VI) проводили по известной методике (Nilsson et al., 1981) при молярном отношении пероксидаза: IgG $\simeq 1{,}95$. Хранили при —20 °С в 50%-ном глицероле.

Фекальные экстракты для анализа методом ELISA. Пробу фекалий смешивали с 10 мл ФСБ (10—50%, по весу) и интенсивно встряхивали до образования однородной суспензии. Крупные частицы отделяли фильтрованием через два слоя марли. Разводили фильтраты равным объемом раствора ФСБ — тритон Х-100 (0,1%), содержащего 20% нормальной овечьей сыворотки. Тестировали сразу или хранили при —20 °С.

Методика ELISA. Поверхность лунок полистирольный платы для микротитрования (Greiner) покрывали аффинно очищенными овечьими иммуноглобулинами (200 мкл), специфичными к антигенам *E. histolytica* в концентрации 4—6 мкг/мл в 0,05 М карбонатном буфере, рН 9,6, в течение 18 ч при 4 °С. Таким образом получали *тест-платы.* Лунки других плат (*контрольных*) точно так же обрабатывали нормальной овечьей сывороткой. В лунки контрольных и тест-плат вносили по 200 мкл тестируемого образца (см. выше) и инкубировали 2,5 ч при 4 °С. Промывали 3 раза по 3 мин раствором ФСБ—0,05%-ный тритон Х-100 (ФСБ—ТХ), добавляли по 200 мкл кроличьей сыворотки против амебных антигенов (24 мкг/мл), разведенной термоинактивированной нормальной овечьей сывороткой, и инкубировали 2,5 ч при 4 °С. Промывали ФСБ—ТХ, вносили по 200 мкл препарата конъюгированных с пероксидазой овечьих антител против F_C-фрагментов Ig кролика, разведенного раствором ФСБ—ТХ, и инкубировали в течение ночи при 4 °С. Отмывали раствором ФСБ—ТХ и добавляли по 200 мкл 0,1%-ного раствора 5-аминосалициловой кислоты (Ellens, Gielkens, 1980) в 0,1 М Na-фосфатном буфере, рН 6,0, содержащем 0,005% H_2O_2 и 1 мМ ЭДТА. Через 30 мин реакцию останавливали добавлением в каждую лунку 50 мкл 1 М NaOH. Измеряли поглощение при 450 нм; для количественной оценки из значений поглощения в опыте вычитали значения поглощения в контрольных платах. В качестве положительных контролей использовали образцы с

известным количеством антигена в растворе ФСБ—ТХ, содержащем также 20%-ную нормальную овечью сыворотку.

Типичные результаты

Использование метода ELISA для определения антигена *E. histolytica*

Кривые титрования, полученные этим методом, свидетельствуют о возможности количественного определения *E. histolytica* в диапазоне от 20 до $5 \cdot 10^3$ клеток/мл, хотя рассматриваются анализируемые образцы могут по-разному влиять на связанные минимальной регистрируемой дозы с использованием шести надежных отрицательных контролей в каждом анализе. Сами анализируемые образцы могут по-разному влиять на связанные с носителем антитела, иногда вызывая их высвобождение в жидкую фазу. При исследовании влияния состава буферного раствора на стадии инкубации с сывороткой было найдено, что введение в состав буфера от 5 до 50% овечьей сыворотки наиболее эффективно предотвращает неблагоприятное воздействие анализируемых образцов на слой адсорбированных иммуноглобулинов (Grundy et al., 1985). При замене ФСБ—Т на ФСБ—ТХ удавалось также значительно повысить чувствительность за счет подавления неспецифических взаимодействий между связанными антителами и конъюгатами, что указывает на гидрофобную природу этих взаимодействий.

В работе (Grundy et al., 1985) проводили анализ клинических образцов от больных с диагнозом, установленным паразитологическими методами. Для 37 из 54 образцов от бессимптомных носителей цист *E. histolytica* и лишь для одного из 24 паразитологически негативных образцов был получен положительный ответ. В последнем случае два дня спустя у больного был зарегистрирован паразитологически положительный диагноз, т. е. ответ, полученный для него методом ELISA, не был ошибочным. Для 3 из 17 больных, инвазированных другими кишечными паразитами, при тестировании амебных антигенов методом ELISA был получен положительный ответ. Перекрестные взаимодействия не обнаруживаются для следующих паразитов: *E. nana, Hymenolepis nana, Entamoeba coli, Giardia lamblia, Strongyloides stercoralis, Ascaris lumbricoides, Trichomonas* и *E. hartmanii.* Один из образцов, по паразитологическим критериям отчетливо положительный в отношении *Iodamoeba*, но отрицательный в отношении *E. histolytica*, по данным метода ELISA оказался положительным. Трудно сказать, являлось ли это результатом истинной перекрестной реакции, поскольку для множества других образцов, содержащих значительные количества *Iodamoeba*, метод ELISA дал отрицательные результаты.

Регистрация с достаточно высокой частотой относительно сложно распознаваемых бессимптомных носителей подтверждает целесообразность эпидемиологического и клинического использования этого теста. В настоящее время проводится изучение его диагностической эффективности при обнаружении как симптомной (инвазивной), так и бессимптомной разновидностей амебиаза.

Обсуждение

Использование метода ELISA для обнаружения антигенов *E. histolytica*

В этом разделе мы рассматриваем последние достижения, иллюстрирующие новые тенденции в развитии иммунодиагностики заболеваний, вызываемых паразитами. Это в первую очередь методы обнаружения специфических антигенов в физиологических жидкостях и выделениях. Этот подход должен заметно повысить эффективность и экономичность диагностики, поскольку он основан на применении простых экспериментальных приемов, позволяющих существенно увеличивать количество анализируемых образцов. Для проведения таких анализов не требуется участия высококвалифицированных паразитологов.

Возможность обнаружения антигенов позволяет специалистам по иммунодиагностике анализировать образцы различного происхождения. Население тропических стран часто отказывается давать кровь из вены. Сам процесс забора крови из вены в полевых тропических условиях требует технического навыка и применения дорогостоящих материалов, к тому же он сопряжен с определенным риском для обследуемого. Достаточно трудоемки и этапы, следующие за забором крови, которые требуют охлаждения проб, их центрифугирования и использования специальных дорогостоящих контейнеров для транспортировки. Процесс отбора проб фекалий и мочи гораздо более прост и безопасен. Любое вызываемое паразитами заболевание обязательно проявляется в присутствии паразитарных антигенов или метаболитов в образцах испражнений, где они могут быть обнаружены с помощью новых методов иммуноанализа. Пока иммуноферментный анализ слишком сложен для тропических условий, им могут пользоваться лишь в центральных аналитических лабораториях. Все еще актуальна проблема создания простого одностадийного иммуноанализа, по технике проведения максимально приближающегося к определению pH по лакмусовой бумажке. Однако для развития упрощенных методов анализа прежде всего необходимо установить, в каких именно физиологических жидкостях и выделениях и в какой концентрации могут находиться те или иные паразитарные антигены, и какова диагностическая или предсказательная значимость их обнаружения. ИФА призван сыграть весьма важную роль в проведении этих исследований.

На сегодняшний день паразитарные антигены с помощью ИФА удается обнаруживать при амебиазе — в экскрементах, при малярии — в крови и у москитов, при филяриатозе и шистозоматозе — в крови и моче.

Заключение

Рассмотрены два новых подхода к иммунодиагностике заболеваний, вызываемых паразитами: 1) быстрый мультиантигенный вариант метода ELISA, основанный на применении множественных неочищенных препаратов антигенов для обаружения антител и 2) метод ELISA для непосредственного обнаружения паразитарных антигенов в клинических образцах.

Для определения специфических антител нами предложен вариант метода ELISA, в котором каждый образец сыворотки тестируется с помощью представительного набора антигенов в течение относительно непродолжительных периодов инкубации (15 мин). При этом надежность лабораторной диагностики обеспечивается благодаря тому, что существует возможность интерпретировать наблюдаемый профиль распределения интенсивности специфических и перекрестных взаимодействий. Выводы, сделанные на основании таких результатов, представляются более достоверными, чем в случае использования единичных антигенных препаратов. Предложенная методика позволяет двум лаборантам за день проанализировать до 700 образцов сыворотки.

Рассмотрено также использование метода ELISA для определения антигенов *E. histolytica* в пробах экскрементов с чувствительностью обнаружения до 20 организмов/мл у бессимптомных переносчиков инвазии. Специфичность анализа подтверждается отсутствием существенных перекрестных взаимодействий с другими кишечными паразитами. Таким образом, на одном примере была показана принципиальная возможность создания надежных систем непосредственного обнаружения паразитарных антигенов. Можно надеяться, что это послужит стимулом к дальнейшей разработке подобных систем анализа и соответственно к значительному прогрессу в области эпидемиологии и массовой иммунодиагностики.

Благодарности

Мы крайне признательны д-ру Гранди, д-ру Воллеру и д-ру Вархурсту за предоставленную нам возможность привести данные из их еще неопубликованной работы. Настоящее исследо-

вание было частично финансировано в рамках специальной программы по исследованию и обучению в области тропических заболеваний (UNDP/World Bank/WHO).

Литература

Carlier Y., Yang J., Bout D., Capron A. (1982). The use of excretory-secretory antigen for an ELISA specific serodiagnosis of visceral larva migrans, Biomedicine, **36**, 39—40.

de Savigny D. (1975). In vitro maintenance of Toxocara canis larvae and a simple method for production of Toxocara ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans, J. Parasitol., **61**, 781—782.

de Savigny D., Voller A., Woodruff A. W. (1979). Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme-linked immunosorbent assay, J. Clin. Path., **32**, 284—288.

Diamond L. S. (1968). Techniques of axenic cultivation of E. histolytica (Schaudin, 1903) and E. histolytica-like amoebae, J. Parasitol., **54**, 1047—1056.

Ellens D. J., Gielkens A. L. J. (1980). A simple method for the purification of 5-aminocalicylic acid. Application of the product as substrate in ELISA, J. Immunol. Meth., **37**, 325—332.

Grundy M. S., Voller A., Warhurst D. (1985). An enzyme linked immunosorbent assay for the detection of E. histolytica antigens in faecal material, Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. (in press).

Maggio T., 1981. Enzyme Immunoassay, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

Matsumura K., Endo R. (1982). Enzyme-linked immunosorbent assay for toxocariasis: its application to the sera of children, Zbl. Bakt. Hyg. I Abt, Orig. A, **253**, 402—406.

Nilsson P., Berquist N. R., Grundy M. S. (1981). A technique for the preparing of defined conjugates of horse-radish peroxidase and immunoglobulin, J. Immunol. Meth., **41**, 81—83.

Sauders G. C., Clinard E. H., Bartlett M. L., Peterson P. M., Sanders Wm., Pyne R. J., Martinez E., 1978. Serological test systems development Report LA-7078-PR, Department of Energy, University of California.

Speiser F. (1980). Application of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of filariasis and echinococcosis, Tropenmed. Parasit., **31**, 459—466.

Speiser F. (1982). Serodiagnosis of tissue dwelling parasites: application of a multi-antigen Enzyme-Linked immunosorbent Assay (ELISA) for screening, Ann. Soc. belge Med. trop., **62**, 103—120.

Speiser F., Gottstein B. (1984). A collaborative study on larval excretory-secretory antigens of Toxocara canis for the immunodiagnosis of human toxocariasis with ELISA, Acta Tropica, **41**. (in press).

Tsang V. C. W., Tao Y., Maddison S. E. (1981). Systematic fractionation of Schistosoma mansoni urea-soluble egg antigens and their evaluation by the single-tube, kinetic dependent enzyme-linked immunosorbent assay (K-ELISA), J. Parasitol., **67**, 340—350.

Tsang V. C. W., Wilson B. C., Maddison S. E. (1980). Kinetic studies of a quantitative single tube enzyme linked immunosorbent assay, Clin. Chem., **26**, 1256—1260.

Tsang V. C. W., Wilson B. C., Peralta J. M. (1983). The quantitative single tube, kinetic dependent Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (K-ELISA), Methods Enzymol., **92**, 391—403.

Van Knapen F., van Leusden J., Polderman A. M., Franchimont J. H. (1983). Visceral larva migrans: Examination by means of enzyme-linked immunosorbent assay of human sera for antibodies to excretory-secretory antigens of the second stage larvae of Toxocara canis, Z. Parasitenkd., **69**, 113—118.

Voller A., de Savigny D. (1981). Diagnostic Serology of tropical parasitic diseases: A review, J. Immunol. Meth., **46**, 1—29.

Глава 24

Использование моноклональных антител в ферментативном иммунометрическом анализе

С. И. Шимицу, Д. С. Кабакофф, Е. Д. Севьер

Введение

С того момента, как в работе (Kohler, Milstein, 1975) было описано получение гибридом, способных в фактически неограниченных количествах продуцировать однородные популяции молекул антител (благодаря чему препараты антител смогли получить статус химически чистых реактивов), для иммунодиагностики открылась буквально новая эра. Нарабатываемые таким образом моноклональные антитела очень быстро нашли адекватное применение в самых различных вариантах иммунометрического (т. е. основанного на применении меченых антител) анализа. Через 6 лет после опубликования работы Кохлера и Милстейна (Kohler, Milstein, 1975) уже были разработаны и введены в повсеместную практику многочисленные варианты РИА и ИФА, основанные на применении меченых моноклональных антител (Sevier et al., 1981). Благоприятные условия проведения реакций в системах с избытком антител (Ekins, 1981) обеспечивают быстрое достижение равновесия и надежное количественное определение антигенов в чрезвычайно низких концентрациях.

Преимущества использования моноклональных антител

Благодаря многочисленным преимуществам, связанным с применением моноклональных антител, особенно в системах с использованием меченых антител, происходит быстрое вытеснение обычных поликлональных антисывороток моноклональными антителами (Sevier, 1982). Однако следует сразу отметить, что использование моноклональных антител практически не дает преимуществ для систем анализа, основанных на применении меченых антигенов (например, в случае конкурентного ИФА) (Wu et al., 1983). Небольшими преимуществами в данном случае оказываются лишь наличие надежного источника стандартных препаратов антител и снятие проблемы перекрестной активности при использовании моноклональных антител с достаточно высокими константами связывания.

Прежде чем начать обсуждение непосредственно систем анализа, следует вкратце рассмотреть особенности самих моноклональных антител, обеспечивающие их преимущества в иммуно-

метрическом анализе. Эти преимущества обусловлены в первую очередь тем, что препараты моноклональных антител характеризуются свойствами химически однородной системы. Это означает, что все молекулы антител в таком препарате в структурном отношении полностью идентичны между собой и все обладают способностью связываться с одним и тем же участком молекулы антигена. Благодаря тщательному скринингу и отбору клонов антител, обладающих сродством к определенной детерминанте искомого антигена, удается свести к минимуму нежелательную активность препаратов антител. Ввиду того что клоны, дающие перекрестные реакции, можно выявить и отбросить еще на клеточном уровне, считают, что для моноклональных антител практически исключено участие в перекрестных реакциях (Di Pietro, 1981).

Гибридные клетки, продуцирующие моноклональные антитела, фактически бессмертны. Они прекрасно приспособлены для роста в культуре или опухолевого развития в организме животного. Применяя стандартные методы работы с культурами клеток, можно обеспечить практически неограниченную наработку моноклональных антител. Это важнейшее преимущество моноклональных антител по сравнению с поликлональными с точки зрения возможностей применения в иммунометрическом анализе.

Процессы введения метки в молекулы антител в химическом отношении ничем не отличаются от мечения любых других белков. Используемые методики оптимизируются эмпирически и, как правило, с трудом поддаются контролю и воспроизведению. Ввиду того что моноклональные антитела доступны практически в неограниченных количествах, введение метки можно проводить сразу с очень большой партией антител, что было бы невозможно при использовании поликлональных антител, доступных лишь в виде партий ограниченного размера. Еще одним преимуществом моноклональных антител, также связанным с их доступностью в неограниченном количестве, является возможность работать в условиях их максимально высокой концентрации в реакционной смеси.

Ферментативный иммунометрический анализ с использованием моноклональных антител

Использование меченых моноклональных антител для проведения ферментативного иммунометрического анализа связано с преимуществами двух типов. В первую очередь мы обсудим преимущества, которые представляют методы, основанные на работе в условиях избытка любых антител, затем — преимущества, которые в связи с этим дают возможность применения в качестве избыточного реагента моноклональных антител.

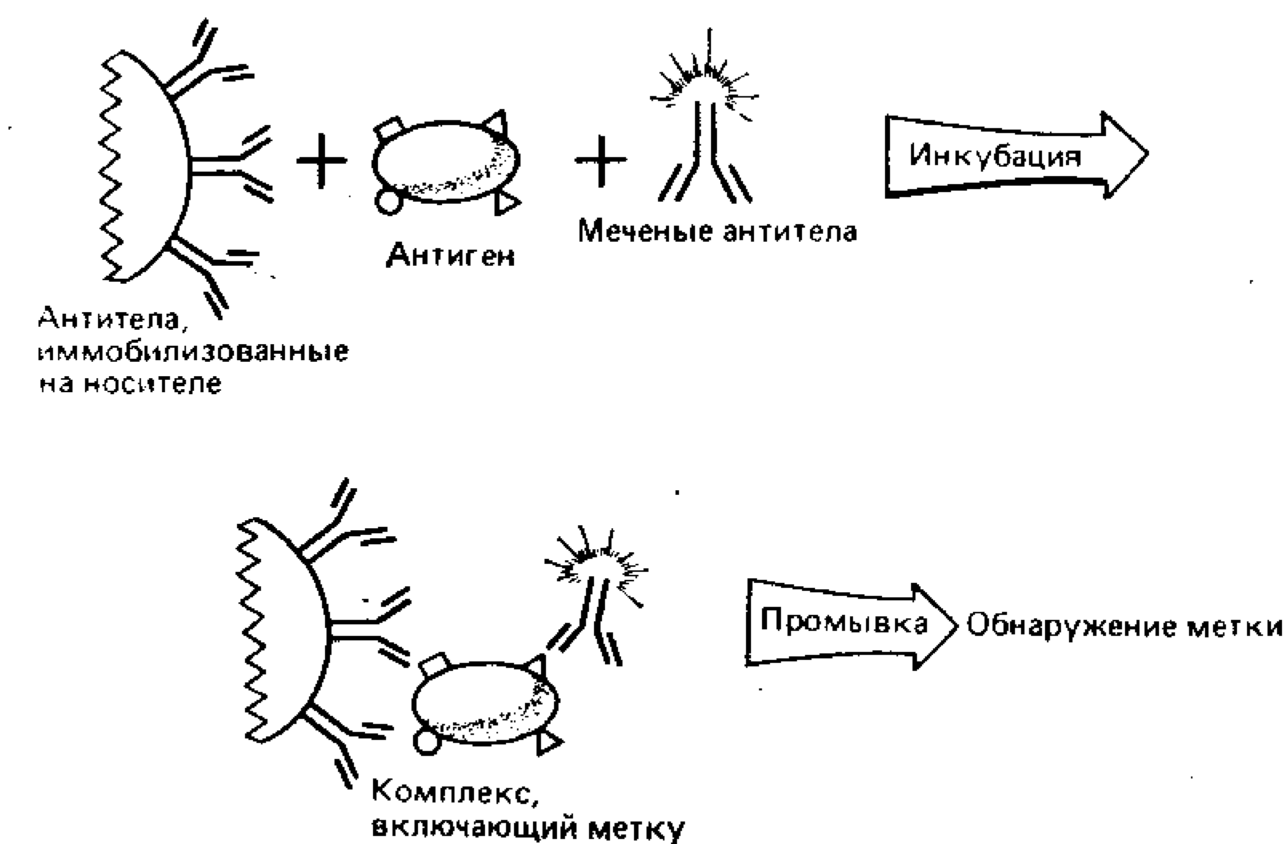


Рис. 24-1. Типичная схема проведения ферментативного иммунометрического анализа с использованием моноклональных антител, иллюстрирующая возможность одновременной инкубации антител, иммобилизованных на носителе, антигена и вторых антител, имеющих ферментную метку.

При осуществлении ферментативных иммунометрических вариантов анализа для определения небольших количеств тестируемого компонента используют высокие концентрации как первичных антител, так и конъюгатов [антитело — фермент]. Компоненты подобных систем анализа изображены на рис. 24-1. Иммобилизованные на носителе («захватывающие») антитела специфичны к определенному уникальному участку структуры антигена. Антитела, входящие в состав ферментного конъюгата, обладают специфичностью к другому участку поверхности молекулы антигена. Поскольку связывание с первыми антителами не препятствует взаимодействию со вторыми — все три компонента можно смешать и инкубировать одновременно. По окончании периода инкубации твердую фазу промывают для удаления избытка всех несвязавшихся компонентов. Количество связавшегося с носителем конъюгата прямо пропорционально количеству связанного антигена.

Большинству иммунологических методов анализа, которые, как правило, являются гетерофазными методами, присущи ограничения, связанные с диффузией. Антиген должен достичь иммобилизованных на твердой фазе антител и вместе с тем связаться с ферментным конъюгатом. При этом антиген и конъюгат должны мигрировать через реакционную среду. При наличии большого избытка антител, иммобилизованных на носителе, адсорбция антигена даже из растворов с очень низкой концентрацией будет проходить весьма эффективно. В роли фактора, направляющего процесс, в этом случае выступает высокая концентрация иммобилизованных антител. Реакции в жидкой фазе также определяются концентрацией антител. В то же время присутствие реагентов в высокой концентрации сводит к минимуму проблемы, связанные с диффузией. Ввиду высокой концентрации антител фактически отпадает необходимость в миграции молекул на значительные расстояния. Благодаря этим эффектам анализ обладает высокой чувствительностью и проводится очень быстро.

Для реализации потенциальных преимуществ системы анализа с использованием меченых антител необходимо работать в условиях избытка связывающих реагентов. В связи с этим поликлональные антисыворотки, доступные в ограниченном количестве, представляют собой далеко не идеальные компоненты иммунометрической системы анализа. Для выделения из поликлональной сыворотки антител, строго специфичных к определенному участку структуры, как правило, необходим достаточно громоздкий процесс очистки, причем очистка может влиять на активность антител и приводить к значительным потерям материала.

Преимущества, присущие моноклональным антителам, обусловлены их гомогенностью. При работе в условиях избытка реагентов преимущества метода меченых антител достаточно очевидны. Во-первых, при использовании иммобилизованных на носителе антител, эффективно осуществляющих первичный захват тестируемого антигена, значительно ослабляется, а в некоторых случаях и полностью подавляется эффект насыщения, называемый «эффектом загиба в области высоких концентраций» (Ryall et al., 1982). С проблемой насыщения приходится сталкиваться практически в любой системе прямого тестирования. В связи с этим создание системы анализа, в которой эта проблема исключается, имеет особо важное значение. Использование моноклональных антител позволяет одновременно легко получить сорбенты с очень высокой емкостью и вводить в систему меченые антитела в высокой концентрации. Для систем, работающих в режиме избытка антител, характерны не только быстрое выполнение анализа и высокая чувствительность определения, но и возможность использования тестируемого антигена в чрезвычайно широком диапазоне концентраций. Концентрационный диапазон, охватываемый в системах анализа, основанных на применении меченых антител, обычно в 3—10 раз шире диапазона, доступного для конкурентного анализа с применением меченого антигена.

Наконец еще одно преимущество метода меченых антител заключается в практически полном исключении непредсказуемых эффектов и колебаний результатов при переходе от одной серии образцов к другой, т. е. так называемых матричных эффектов (Ekins, 1981). Изменение в содержании липидов, белков или других компонентов может существенно сказываться на результатах определения антигена в сыворотке. При тестировании антигена в моче такого рода сложности могут возникать из-за различий в ионной силе, pH, концентрации белков или удельном весе образцов. В системах, основанных на непосредственной регистрации реагента с определенной ограниченной концентрацией, небольшие изменения в матричных характеристиках самого образца могут заметно искажать результаты анализа. Более того, даже когда в образце не содержится тестируемого компонента, матричный эффект может имитировать его присутствие и, таким образом, приводить к завышению результатов анализа. Вероятность воздействия примесных компонентов на скорость связывания антиген — антитело при низких концентрациях реагента достаточно велика, поскольку эти компоненты присутствуют в концентрации, сопоставимой с концентрацией самого реагента. При использовании избыточных количеств реагента матричные эффекты заметно подавляются (Fritz, Bunker, 1982). В этом случае изменения в содержании примесных компонентов практически не влияют на связывание с антигеном, поскольку сами реагенты содержатся в системе в значительно более высоких концентрациях.

Введение моноклональных антител в систему анализа, основанную на применении меченых антител, позволяет улучшить бо́льшую часть характеризующих ее параметров. Химическая гомогенность моноклональных антител обеспечивает надежность и воспроизводимость анализа. Кроме того, использование для иммунометрического анализа моноклональных антител, конъюгированных с ферментом, позволило приблизиться к реализации режима кинетики первого порядка (Barany, 1980). Порядок химической реакции соответствует показателю степени у величины концентрации реагента в кинетическом уравнении. Реакциям, скорость которых постоянна и не зависит от концентрации, соответствует нулевой порядок. Если концентрация одного из реагентов лимитирована, то скорость реакции оказывается пропорциональна его концентрации. Если лимитирующими оказываются два или три реагента, то скорость реакции зависит от концентрации каждого из реагентов и кинетика реакции приобретает сложный характер.

Теперь обратимся к условиям проведения иммунометрического анализа. Использование избытка реагентов позволяет работать в условиях протекания реакции первого порядка. Благодаря этому между измеряемым сигналом и концентрацией тестируемого компонента существует линейная зависимость при условии химической однородности используемых реагентов. Что же касается поликлональных антител, то присущая им химическая гетерогенность, связанная с присутствием в популяции молекул с различной аффинностью, ограничивает возможности их использования для линейного иммунометрического анализа. Препараты моноклональных антител, напротив, с химической точки зрения представляют собой идеальный тип реагента, поскольку могут быть использованы в большом избытке и содержат молекулы с абсолютно одинаковой реакционной способностью.

Линейный ферментативный иммунометрический анализ

Для получения линейных калибровочных кривых система иммунодиагностирования должна удовлетворять трем критериям. Первый из них, как было отмечено выше, связан с необходимостью использования реагентов в значительном избытке. Второй критерий, также рассмотренный выше, заключается в химической однородности реагентов. И третий сводится к условию линейного «перевода» параметра, характеризующего глубину протекания химической реакции, в интенсивность собственно измеряемого сигнала. Для этого обычно используют введение в состав антител ферментной метки, поскольку при работе с необходимыми избыточными количествами антител, использование радиоизотопов часто не позволяет достичь включения, соответствующего достаточно высокой удельной активности в препарате.

Для проведения линейного иммунодиагностического анализа с успехом удается использовать моноклональные антитела, конъюгированные со щелочной фосфатазой в качестве индикаторного фермента. Благодаря наблюдаемому линейному характеру калибровочной кривой для ее построения требуется гораздо меньшее число точек, чем в традиционных вариантах иммунологического тестирования. В качестве примера на рис. 24-2 приведена линейная калибровочная кривая для анализа хориогонадотропина.

Методы

Для определения хориогонадотропина человека (ХГТЧ) использовали специальный набор реактивов «TANDEM^R-E HCG» производства Hybritech Inc. (США). Анализ проводили в соответствии с прилагающейся к этому набору инструкцией. Вкратце методика определения ХГТЧ сводится к инкубации 100 мкл образца с гранулами носителя, покрытыми моноклональными антителами, специфичными к α-субъединице этого белка, в пластиковой пробирке (12×75 мм). После добавления образца в пробирку вносят 100 мкл препарата моноклональных антител, специфичных к β-субъединице ХГТЧ, конъюгированных с щелочной фосфатазой. Реакционную смесь инкубируют 2 ч при 37 °С и избыток конъюгата удаляют с помощью соответствующего промывочного раствора. В каждую пробирку добавляют по 200 мкл раствора субстрата — *п*-нитрофенилфосфата. Через 15 мин добавляют по 1,5 мл раствора, останавливающего ферментативную реакцию, и измеряют оптическую плотность при 405 нм.

Таблица 24-1. Требования, предъявляемые к системе иммуноанализа, для обеспечения линейности калибровочной кривой

1. Присутствие большого избытка меченых антител. Лимитирующим фактором в реакции должна быть концентрация тестируемого компонента
2. Однородная реакционная способность меченых антител по отношению к тестируемому веществу
3. Прямая пропорциональность между интенсивностью измеряемого сигнала и концентрацией комплекса [меченые антитела — тестируемое вещество].

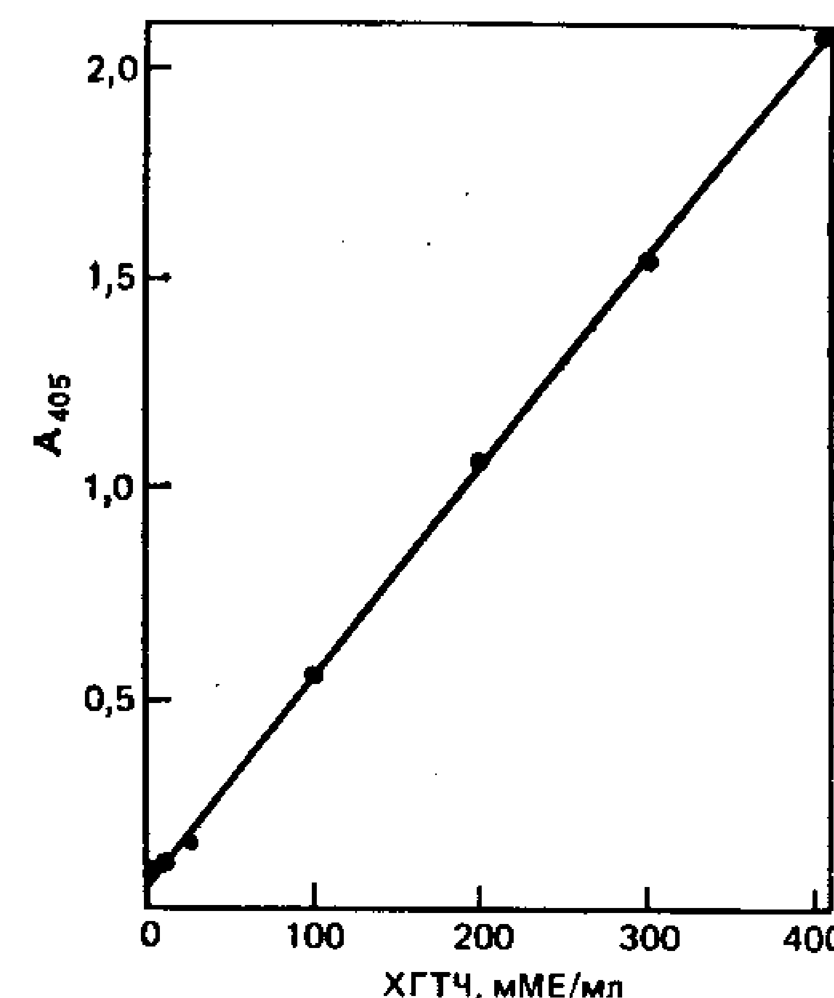


Рис. 24-2. Линейная калибровочная кривая определения хориогонадотропина человека (ХГТЧ) в концентрационном диапазоне 0—400 мМЕ/мл.

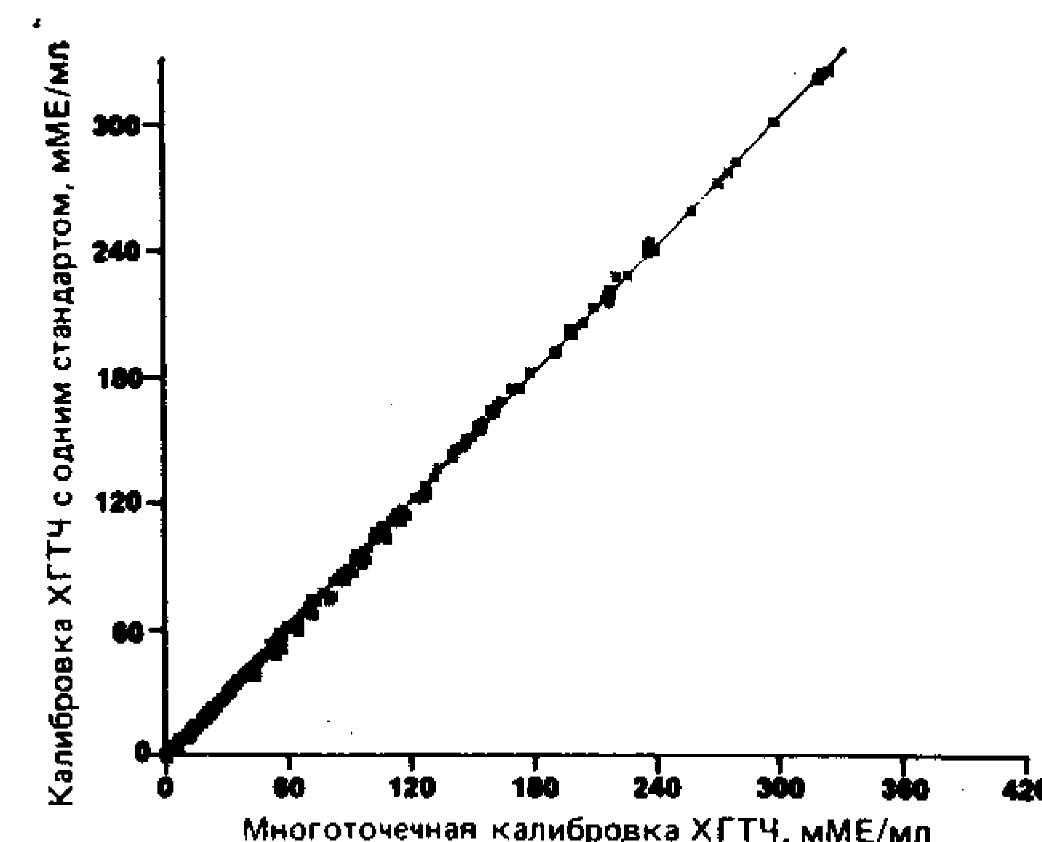


Рис. 24-3. Корреляция результатов определения ХГТЧ в различных препаратах, полученных с использованием многоточечной калибровки и калибровки по одному положительному стандарту.

Калибровка

При соблюдении условий линейности для построения калибровочной кривой можно использовать систему единичного стандарта. Реально калибровочная кривая может быть получена просто путем проведения прямой линии через две точки, соответствующие отрицательному (нулевому) контролю и одному положительному калибровочному стандарту. Анализ данных при этом сводится к простой линейной интерполяции с использованием уравнения $y=mx+b$, где y — искомое значение, m — наклон калибровочной кривой, x — оптическая плотность для тестируемого образца, b — пересечение с осью ординат (или интенсивность сигнала в отрицательном контроле). На рис. 24-3 показана корреляция результатов определения ХГТЧ, полученных с использованием многоточечной и двухточечной калибровочных кривых. Видно, что результаты, полученные в системе единичного стандарта, практически не отличаются от результатов традиционной для ИФА обработки данных с использованием широкого набора стандартов.

Расширение диапазона тестирования при работе на двух длинах волн

Конъюгат [антитело — щелочная фосфатаза], содержащийся в избытке, катализирует образование окрашенного продукта прямо пропорционально концентрации фермента, причем эта зависимость, по-видимому, сохраняется и при $A_{405}>2$ ед., где уже оптическую плотность нельзя надежно измерить. Для расширения концентрационного диапазона (в рамках сохранения линейности) можно попытаться измерять оптическую плотность при длине волны, соответствующей меньшей экстинкции (Saunders et al., 1984). Максимум поглощения для *п*-нитрофенола соответствует $\lambda=405$ нм. При $\lambda=450$ нм экстинкция *п*-нитрофенола составляет примерно одну пятую экстинкции в максимуме. Это означает, что, проводя измерения при двух длинах волн — 405 и 450 нм, можно в пять раз поднять допустимый верхний предел концентрации тестируемого компонента. При работе с обычным спектрофотометром это связано с необходимостью постоянного переключения длины волны с 405 на 450 нм для каждого образца. В то же время на фотометре со сменными фильтрами, рассчитанном на несколько длин волн и управляемом микропроцессором, можно делать то же самое в автоматическом режиме. Сравнивая значения поглощения, полученные при двух длинах волн, процессор может выбирать одно из них, более подходящее для расчета концентрации образца. Построенная таким образом система обеспечивает высокую чувствительность благодаря измерениям в максимуме и в то же время позволяет одновременно расширить концентрационный диапазон за счет дополнительных измерений при длине волны, соответствующей меньшей экстинкции. Существенно помнить, что чувствительность ферментативного иммунометрического анализа практически полностью определяется удельной ферментативной активностью конъюгата [фермент — антитело]. В связи с этим любое повышение удельной активности конъюгата, не сопровождающееся усилением его неспецифического связывания, будет приводить к повышению чувствительности, т. е. к снижению минимального значения концентрации тестируемого компонента, поддающегося определению данным методом анализа.

Двухцентровая избирательность

При двухцентровом иммунометрическом анализе моноклональные антитела обладают еще одним преимуществом по сравнению с обычными поликлональными антителами. Они придают ему бóльшую специфичность, или избирательность. Обнаружение молекул данного типа основано на взаимодействии антител с их уникальными антигенными детерминантами. Специфичность

антител в широком смысле отражает, насколько избирательно они взаимодействуют с антигенными молекулами данного типа. Когда речь идет о поликлональных антителах, то под этим подразумевается специфичность взаимодействия с многочисленными антигенными детерминантами, которые в совокупности могут быть, а могут и не быть уникальными, т. е. присущими только искомым молекулам. В случае моноклональных антител, специфичных к единичной антигенной детерминанте, вероятность реализации взаимодействия только с уникальной детерминантой молекул данного типа существенно выше. Преимущества в избирательности взаимодействия проявляются еще более отчетливо при использовании моноклональных антител в двухцентровом иммунометрическом анализе. При этом способе проведения анализа наиболее эффективно и избирательно определяют неповрежденные молекулы данного типа, поскольку условием их регистрации является обязательное присутствие в рамках единой структуры одновременно двух уникальных антигенных детерминант. Такая система анализа обладает двумя важнейшими преимуществами по сравнению с традиционными вариантами конкурентного иммуноанализа. Во-первых, поскольку для образования «сэндвича» с антителами, при помощи которого метка связывается с твердой фазой, необходимы две антигенные детерминанты, данным методом можно определять молекулы антигена с двумя детерминантами. Это преимущество проявляется в увеличении специфичности анализа ввиду того, что идентификация молекулы производится на основании узнавания сразу двух определенных антигенных детерминант, а не одной, как в случае конкурентного анализа. При конкурентном анализе бывают случаи, когда в качестве калибровочных стандартов или контрольных образцов используют препараты, которые помимо целого антигена содержат его фрагменты, обладающие антигенной активностью. Легко заметить, что системы анализа, основанные на определении антигенных детерминант, не обязательно входящих в состав целого искомого компонента, будут давать результаты, в количественном отношении отличные от результатов анализа с неповрежденными молекулами тестируемого соединения. Двухцентровый иммунометрический анализ в большей степени, чем другие варианты анализа, обеспечивает выявление именно интактных молекул антигена.

В качестве еще одного характерного примера можно отметить иммуноанализ МВ-изофермента креатинкиназы (КК-МВ) (см. рис. 24-4). Фермент креатинкиназы в больших концентрациях присутствует в цитоплазме клеток мозга, скелетной и сердечной мышц. Фермент существует в виде димера, составленного из субъединиц типа М и В, и может быть представлен изоферментными формами состава ММ, МВ и ВВ. Форма КК-МВ обнаруживается почти исключительно в клетках сер-

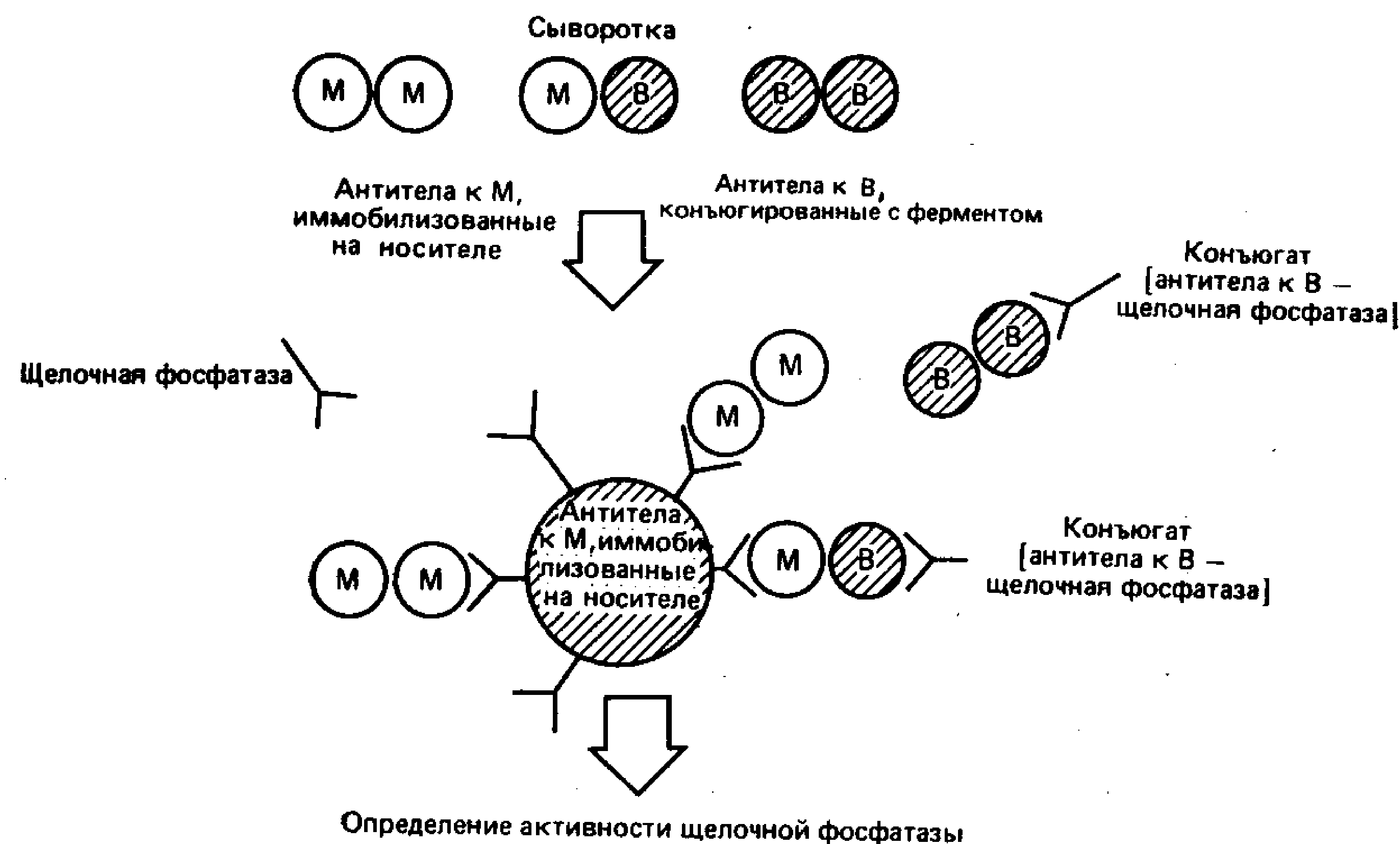


Рис. 24-4. Схема иммуноанализа, специфичного по отношению к МВ-изоферменту креатинкиназы. Присутствие ММ- и ВВ-изоферментных форм не сказывается на определении МВ-изофермента.

дечной мышцы, а ее присутствие в сыворотке указывает на наличие сердечного заболевания, например инфаркта миокарда. При ИФА, основанном на применении иммобилизованных моноклональных антител, специфичных к М-субъединицам, в качестве компонента ферментного конъюгата антител, специфичных к В-субъединицам, можно избирательно обнаруживать МВ-форму в присутствии изоферментов типа ММ и ВВ.

Визуальный ферментативный иммунометрический анализ

Располагая системой ИФА, в которой видимая глазом окраска развивается при содержании в образце антигена в концентрации, соответствующей некоторому положительному диагнозу, можно разработать простой метод эффективного скрининга многочисленных пациентов. Так, с использованием двухцентрового ферментативного иммунометрического анализа на базе моноклональных антител была разработана методика определения беременности, основанная на обнаружении в крови хориогонадотропина.

По своей технологии двухцентровые скрининг-тесты практически не отличаются от количественных вариантов анализа. В обоих случаях наблюдаются диффузионные ограничения, связанные с необходимостью миграции молекул через раствор для участия в реакции на поверхности твердой фазы. Иммобилизация на носителе облегчает процесс удаления избытка меченых антител, однако присущие гетерогенным системам ограничения в скорости реакций делают такой анализ недостаточно быстрым для использования в качестве скрининг-теста.

Одним из решений проблемы является повышение частоты столкновений между молекулами антител и антигенов. Этого можно достичь при пропускании раствора антигена через мембрану, покрытую антителами. Высокая концентрация иммобилизованных на мембране антител и небольшие диффузионные расстояния способствуют достаточно быстрому протеканию реакции, фактически за время, необходимое для пропускания данного объема жидкости через мембранный фильтр. Точно так же через мембрану пропускают раствор меченных ферментом антител, вступающих в реакцию с такой же скоростью. После отмывания избытка несвязавшихся меченых антител через фильтр пропускают раствор субстрата. Поскольку концентрация антител очень высока, удается за короткое время анализа обнаруживать антиген в растворах с очень низким его содержанием. Разработаны системы тестирования хориогонадотропина, позволяющие за 3 мин обнаруживать его в растворах с содержанием не более 25 мМЕ/мл.

До настоящего момента мы рассматривали главным образом преимущества замены поликлональных антител моноклональными для целей иммунометрического анализа. Повышение чувствительности, специфичности и воспроизводимости результатов (для различных партий антител) является безусловным вкладом в арсенал существующих методов. Однако этим дело не исчерпывается. Становится все более очевидным, что моноклональные антитела обладают рядом уникальных свойств, которые невозможно было выявить при работе с поликлональными антисыворотками. Для моноклональных антител удалось изучить, как это делается обычно для любых других белков, зависимость их функциональной активности от таких параметров окружающей среды, как pH, ионная сила, температура, присутствие детергентов. Несомненно, компонентам поликлональной антисыворотки присущи подобные свойства, которые, однако, из-за гетерогенности популяции молекул в таких препаратах не поддаются четкому выявлению. Наблюдать влияние указанных факторов можно только при работе с химически однородной популяцией антител. В качестве примера можно рассмотреть влияние pH на связывание моноклональных антител с гормоном роста человека (ГРЧ) (рис. 24-5). При pH 7 наблюдается образование прочного комплекса антител с ГРЧ, который при pH 4 и ниже разрушается с высвобождением молекул гормона (Bartholomew et al., 1983). Другие моноклональные антитела к этому же гормону не обнаруживают подобных свойств, прочность их связывания с ГРЧ при изменении pH в указанном диа-

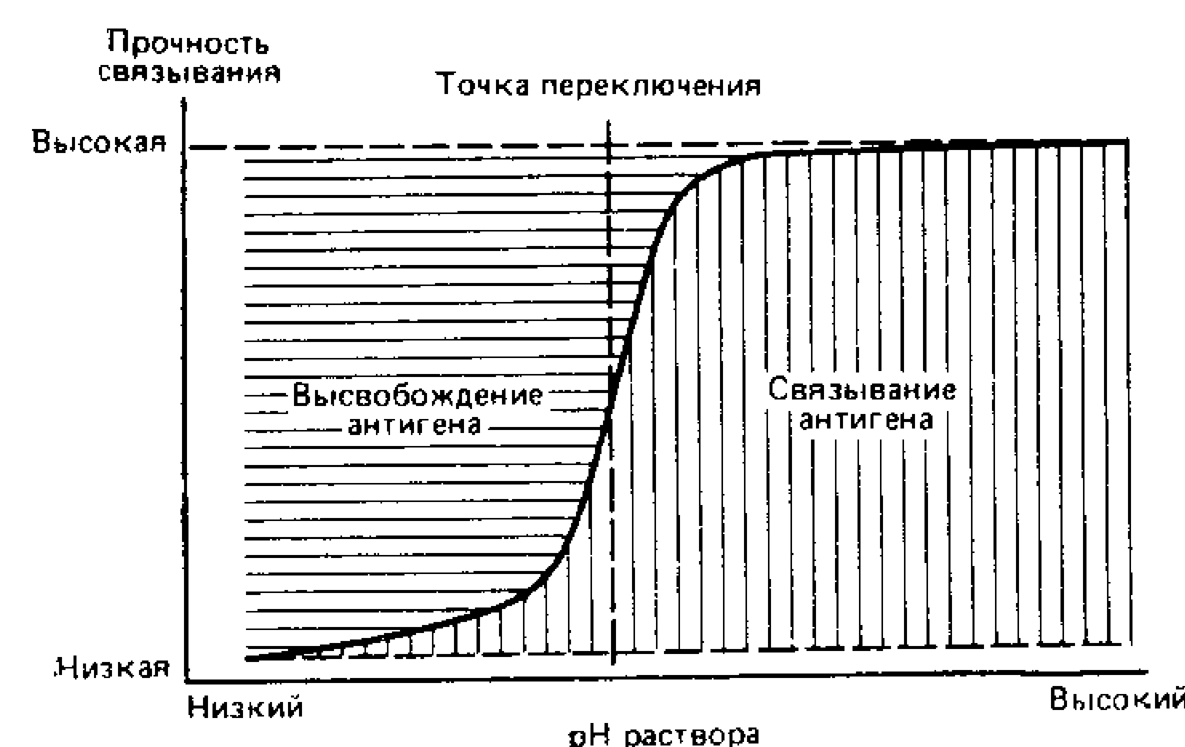


Рис. 24-5. Зависимость связывания антигена от рН среды.

пазоне остается неизменной. Такая зависимость от рН может быть связана с конформационными изменениями в области, соответствующей антигенной детерминанте гормона, или центра связывания в структуре антител. Можно осуществлять отбор моноклонов по принципу чувствительности к определенным факторам среды и использовать в дальнейшем свойства отобранных моноклональных антител для высвобождения в раствор связавшегося антигена перед его непосредственным количественным определением. Если тестируемый антиген был связан в виде комплекса со вторыми мечеными антителами, то высвобождение в раствор такого комплекса будет способствовать более эффективному протеканию индикаторной ферментативной реакции.

Другой вариант применения моноклональных антител связан с возможностями аффинной очистки антигена. Моноклональные антитела, чувствительные к изменению рН, могут быть иммобилизованы на носителе и использованы для избирательного удаления антигена из сложной смеси. При промывке такого сорбента буфером с соответствующим значением рН элюируется искомый антиген (рис. 24-6).

Получение бифункциональных моноклональных антител

Обычно молекулы антител содержат по два идентичных центра связывания. С использованием техники получения моноклональных антител удалось создать уникальную конструкцию, которая представляет собой молекулу антитела с двумя неидентичными центрами связывания (Martinis et al., 1982) (рис. 24-7). Было проведено слияние клеток гибридомы, продуцирующей мышиные моноклональные антитела против кислой фосфатазы простаты (КФП), с клетками селезенки мыши, иммунизированной поверхностным антигеном вируса гепатита В. Выделенные моноклоны обладали способностью связываться одновременно с обоими антигенами. Антитела, продуцируемые одним из клонов, удалось разделить хроматографией на ДЭАЭ-сефадексе на 3 фракции. Было показано, что одна из этих фракций содержит антитела, специфичные только к КФП, другая — антитела, специфичные к поверхностным антигенам вируса гепатита В,

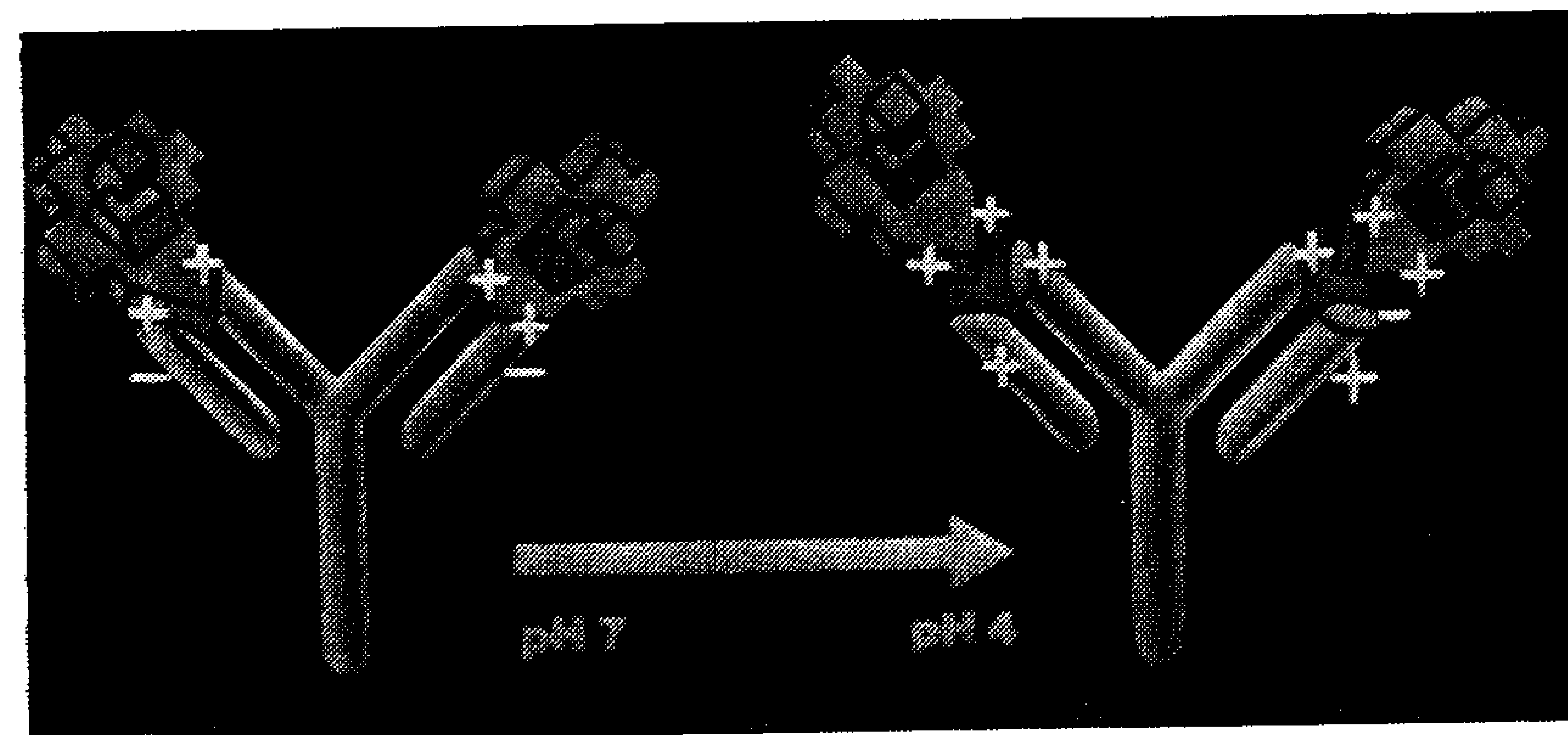


Рис. 24-6. Связывание антигена с «переключаемыми» антителами при рН 7 и высвобождение его из комплекса при рН 4.

а третья — антитела с двойной специфичностью к КФП и антигенам вируса в пределах одной и той же иммуноглобулиновой молекулы. Одно из возможных использований таких антител с двойной специфичностью может заключаться в получении конъюгатов [фермент — антитело] без какой бы то ни было химической модификации компонентов. Один из центров связывания при этом может обладать специфичностью к индикаторному ферменту — пероксидазе или щелочной фосфатазе, а другой — к искомому антигену. Такой комплекс [фермент — антитело] может использоваться в любом варианте двухцентрового иммунометрического анализа.

Моноклональные антитела к раковым антигенам

Еще одна область применения моноклональных антител связана с диагностикой рака. С использованием гибридомной технологии удалось обнаружить ряд уникальных раковых маркеров, в частности маркеры СА125 и СА19-9 (Koprowski et al., 1979). Маркер СА125 был обнаружен с помощью моноклональных антител, полученных от мыши, иммунизированной клетками линии карциномы яичников. Было обнаружено, что соответствующий антиген экспрессируется в большинстве случаев карциномы немуцинового эпителия яичников и его определение может быть использовано для диагностики рака яичников. Маркер СА19-9 обнаруживается при гастроинтестинальной аденокарциноме. Антитела к этому маркеру были получены при иммунизации клетками линии карциномы толстой кишки. В на-

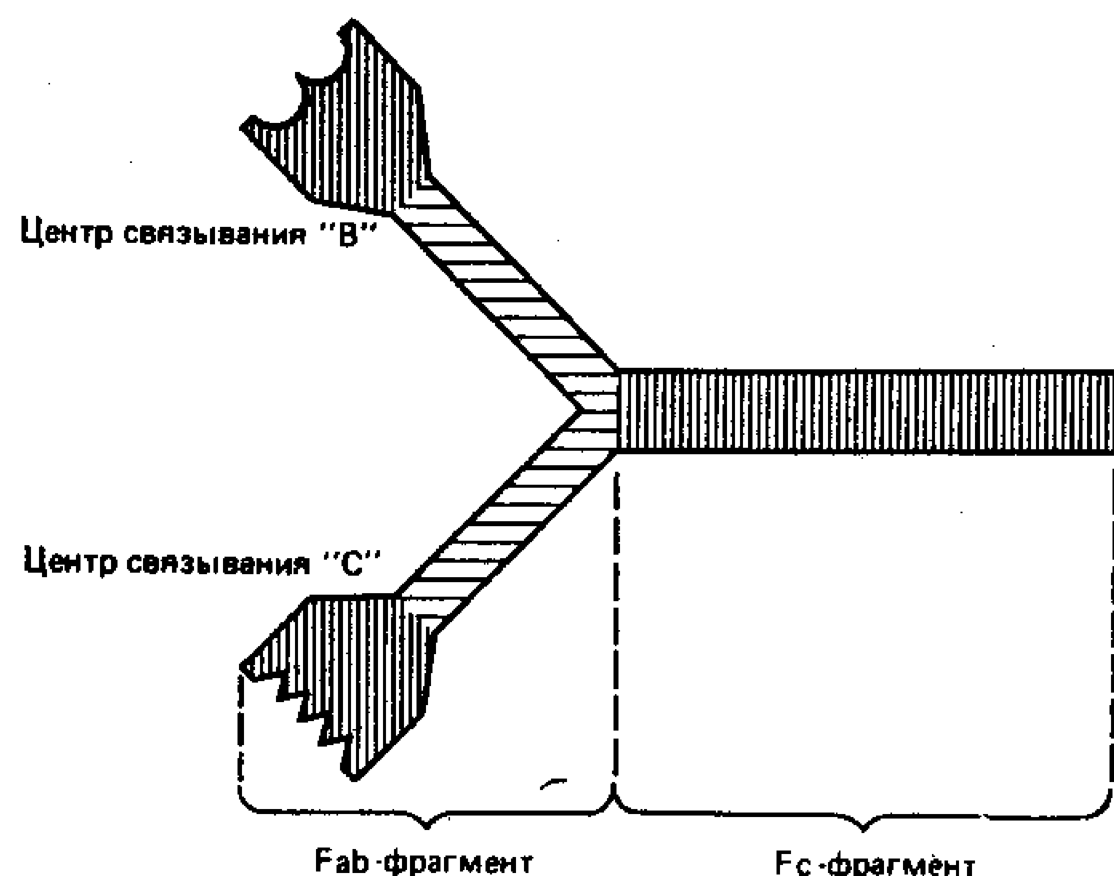


Рис. 24-7. Бифункциональные моноклональные антитела, содержащие два центра связывания антигена.

стоящее время исследуется возможность использования его в качестве маркера панкреатической карциномы и других видов желудочно-кишечных раковых заболеваний. Благодаря развитию методов получения гибридом и отбора специфических клонов появилась возможность идентифицировать антитела, узнающие уникальные антигенные детерминанты определенных клеточных линий. Обнаружение соответствующих детерминант или маркеров может использоваться для тестирования раковых заболеваний.

В работе Эрлиха и Мойла (Erlich, Moyle, 1983) описана еще одна уникальная особенность моноклональных антител. Используя в качестве модельного антигена ХГТЧ, авторы показали, что в смеси, содержащей некоторые моноклональные антитела, наблюдается «кооперативное» связывание антигена с образованием кольцевых комплексов. Показано, что для некоторых пар антител аффинность по отношению к ХГТЧ заметно выше, чем для каждого из этих антител в отдельности. При этом необходимыми факторами являются наличие по крайней мере двух эпитопов и использование антител, способных связываться одновременно. Установлено, что для максимальной реализации этого эффекта необходимо участие интактных молекул антител.

Предложен новый вариант иммуноанализа, названный «4i», в основу которого положен принцип ингибирования взаимодействия типа идиотип — антиидиотип (Potocnjak, 1982). Для определения искомого компонента используют систему двух моноклональных антител, только одно из которых специфически взаимодействует с этим компонентом. При этом одно из используемых антител обладает специфичностью к одному из эпитопов искомого антигена, а другое — непосредственно к центру связывания в структуре первого антитела. В результате в такой системе протекают процессы конкурентного связывания. Один из этих процессов — связывание антител А с антигеном, а другой — связывание антител В с центром узнавания антигена в структуре антител А. Связывание антител А с антигеном препятствует связыванию антител В с антителами А. В созданной на этой основе системе анализа повышение концентрации тестируемого компонента сопровождается соответствующим снижением интенсивности регистрируемого сигнала.

Краткое содержание

Моноклональные антитела благодаря таким свойствам, как химическая гомогенность, высокая аффинность и доступность в больших количествах, могут весьма эффективно использоваться для иммунодиагностических тестов. Названные особенности моноклональных антител в сочетании с применением ферментативных иммунометрических вариантов тестирования позволяют при проведении клинических анализов с высокой точностью, чувствительностью и надежностью количественно определять тестируемый антиген. При удачном выборе индикаторного фермента процесс анализа может существенно упроститься за счет калибровки по одному положительному стандарту. Помимо повышения эффективности уже существовавших методов анализа с помощью моноклональных антител удается выявить новые антигенные детерминанты, появление которых связано с протеканием раковых и других заболеваний. Таким образом, химическая однородность моноклональных антител открывает перед исследователями практически неограниченные возможности.

Литература

Barany G. (1980). The explicit analysis of consecutive pseudo-first-order reactions, Anal. Biochem., **109**, 114—122.

Bartholomew R., Beidler D., David G., Hill C., 1983. Switch immunoaffinity chromatography with monoclonal antibodies, Biotechniques, Vol. 1.

DiPietro D. L. (1981). Ectopic pregnancy: interpreting hCG levels, Laboratory Management, **19**, 43—51.

Ekins R., 1981. Towards immunoassays of greater sensitivity, specificity and speed: an overview. In: Monoclonal Antibodies and Developments in Immunoassay, A. Albertini and R. Elkins, eds.

Erlich P. H., Moyle W. R. (1983). Cooperative immunoassays: ultrasensitive assays with mixed monoclonal antibodies, Science, **221**, 279—281.

Fritz T. J., Bunker D. M. (1982). Hyperlipidemia interference in radioimmunoassays, Clin. Chem., **28**, 2325.

Kohler G., Milstein C. (1975). Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature (London), **256**, 495—497.

Koprowski H., Steplewski Z., Mitchell K., Herlyn M., Herlyn D., Fuhrer P. (1979). Colorectal carcinoma antigens, Somatic Cell Genetics, **957**, 972.

Martinis J., Kull J. F., Franz G., Bartholomew R. M., 1982. Monoclonal antibodies with dual antigen specificity, III Annual Colloquium.

Potocnjak P., Zavala F., Nussenzweig R., Nussenzweig V. Inhibition of idiotype-anti-idiotype interaction, Science, **215**, 1637—1639.

Ryall R. G., Story C. J., Turner D. R. (1982). Reappraisal of the causes of the "hook effect" in two-site assays, Anal. Biochem., **127**, 308—315.

Saunders R. L., David G. S., Sevier E. D. (1984). Monoclonal antibodies: advances in in vitro and in vivo diagnostics, Pathologist, **38**, 638—646.

Sevier E. D., David G. S., Martinis J., Desmond W. J., Bartholomew R. M., Wang R., 1981. Monoclonal antibodies in clinical immunology, Clin. Chem., **27**, 1797—1806.

Sevier E. D. (1982). Monoclonal antibodies: expanded potential for labeled antibody ligand assays, J. Am. Med. Tech., **48**, 651—653.

Wu T., Ballon S. C., Teng N. N. H. (1983). Monoclonal versus polyclonal antibody radioimmunoassay against the beta-subunit of HCGT in patients with gestational trophoblastic neoplasia, Am. J. Obstet. Gynecol., **147**, 821—828.

Глава 25

Определение активности пероксидазы методом Нго — Ленхоффа (в системе МБТГ—ДМАБК)

В. Д. Джиохиган

Введение

Метод Нго — Ленхоффа — это новый чувствительный метод обнаружения активности пероксидазы хрена (ПХ), а также других ферментов в сопряженных системах (Ngo, Lenhoff, 1980). Метод характеризуется чрезвычайно высокой чувствительностью и позволяет обнаруживать ПХ при концентрации в растворе до 2—5 фмоль/мл (Ngo, Lenhoff, 1980; Geoghegan et al., 1983). Столь высокая чувствительность достигается благодаря образованию индаминового красителя с коэффициентом молярной экстинкции 47 600 в ходе реакции окислительного сочетания 3-метил-2-бензотиазолинонгидразона (МБТГ) и 3-(диметиламино)бензойной кислоты (ДМАБК) (Ngo, Lenhoff, 1980).

Краткая история возникновения этой системы индикации начинается с работы Хьюнига и Фриша (Hunig, Fritsch, 1957). Именно эти авторы впервые описали механизм реакции окислительного сочетания, приводящей к образованию индаминового красителя. В качестве одного из примеров они использовали взаимодействие МБТГ и диметиланилина (ДМА) (рис. 25-1). Окислительное сочетание протекало в присутствии хлорида железа(III) или иного окислителя из использованного ими набора реагентов. Наиболее существенным обстоятельством явилась отмеченная авторами возможность проведения реакции под воздействием H_2O_2 в присутствии ионов Fe^{2+}. Образующийся краситель характеризовался высоким значением молярной экстинкции — 79 500 в метаноле. Эта реакция приобрела особую привлекательность, поскольку она обеспечивала высокую чувствительность определения, которая достигалась с помощью подобного красителя.

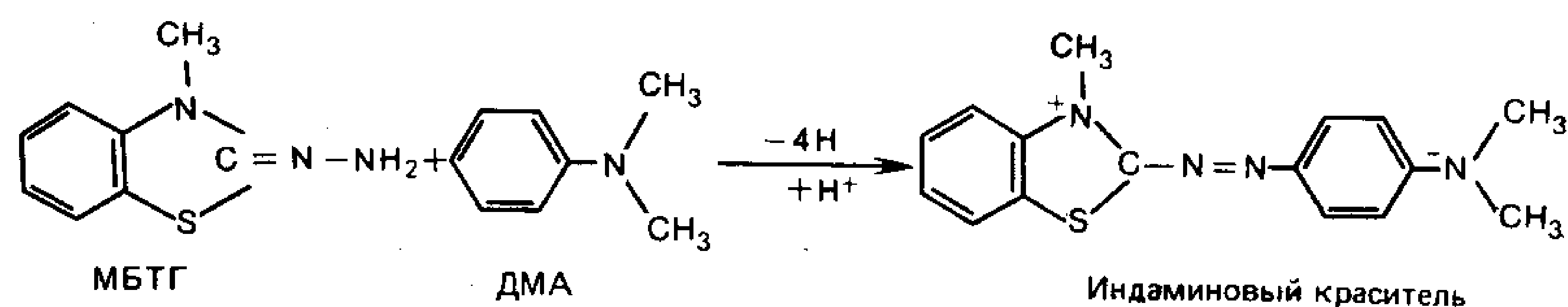


Рис. 25-1. Взаимодействие МБТГ и ДМА с образованием индаминового красителя.

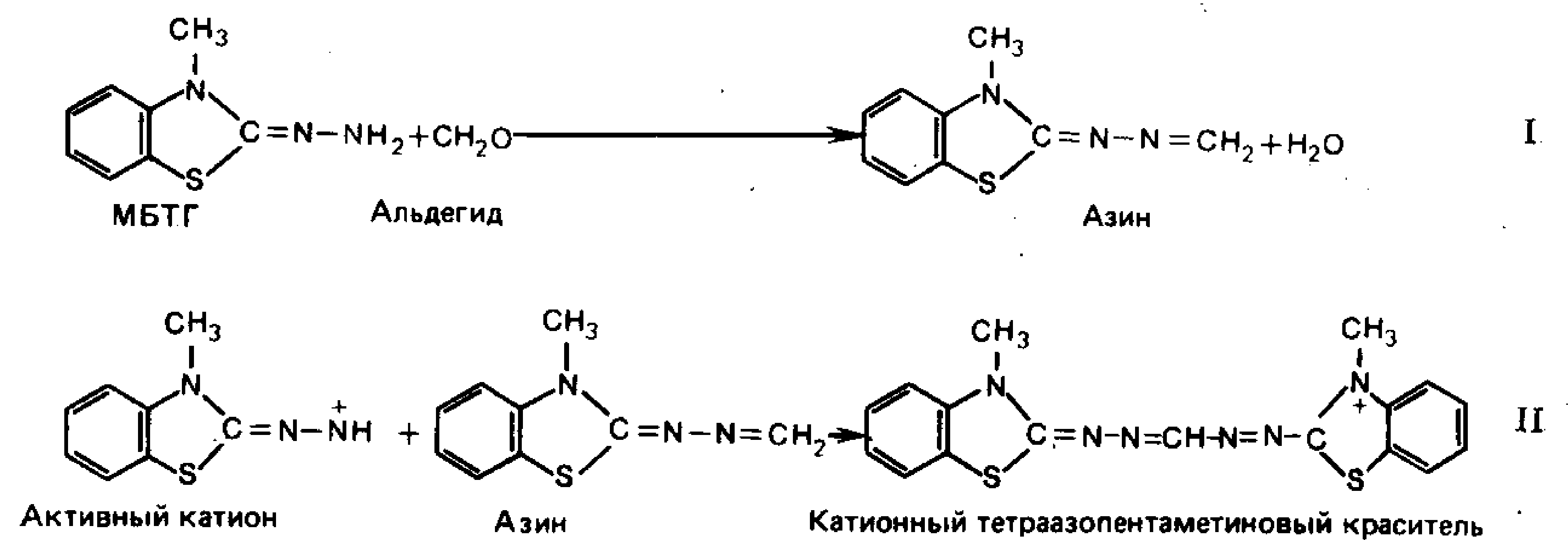


Рис. 25-2. Механизм реакции МБТГ с альдегидом, ведущей к образованию катионного тетраазопентаметинового красителя (Sawicki et al., 1961).

МБТГ впервые был использован для обнаружения водорастворимых алифатических альдегидов в кислой среде (Sawicki et al., 1961). Реакцию проводили в две стадии. На первой (I) происходила конденсация МБТГ с альдегидом с образованием азина (рис. 25-2). Азины содержат активированный атом водорода, который участвует во второй стадии процесса. Вторая стадия (II) начинается с добавления $FeCl_3$ (рис. 25-2), в результате чего оставшийся в смеси МБТГ окисляется с образованием активного катиона. Этот катион и взаимодействует с азином с образованием голубого катионного тетраазопентаметинового красителя (Hunig, Fritsch, 1957; Hunig, 1962). Молярная экстинкция этого красителя в ацетоне достигает 76 000 в максимуме поглощения при 670 нм. По другим данным (Sawicki et al., 1961), он характеризуется молярной экстинкцией 67 000 и наличием в спектре двух максимумов — при 635 и 670 нм. Такие особенности этого красителя, как простота образования в рамках аналитической методики и высокая молярная экстинкция, привлекли к нему внимание исследователей.

Взаимодействие МБТГ с другими реагентами обычно проводили при нагревании или в кислой среде. В подобных условиях МБТГ использовали для детектирования гексозаминов гликозаминогликана (Smith, Gilkerson, 1979) и большого набора других карбонильных соединений (Paz et al., 1965). Сообщалось, что при определении карбонильных соединений азины образуются при 40 °С и pH 4. Несмотря на отсутствие видимой окраски, азиновые производные карбонильных соединений обладают характерными спектрами при pH 1, что позволяет проводить их идентификацию. Тетраазопентаметиновые красители образуются из соответствующих азинов после нагревания до 100 °С, охлаждения и добавления $FeCl_3$. При использовании аналогичного подхода для количественного определения сиаловой кислоты образование красителя происходило без нагревания в том случае,

Таблица 25-1. Вещества, реагирующие с МБТГ в кислой среде[1]

Алифатические альдегиды	(Sawicki et al., 1961)
Альдегидные производные пиридина	
Анилин	
N-алкиланилины	
N, N′-диалкиланилины	
Полиядерные ароматические амины	
Диариламины	
Индолы	
Карбазолы	
Фенотиазины	
Гидроксиальдегиды	
Диальдегиды	(Paz et al., 1965)
Альдегидокислоты	

[1]) С повышением молекулярного веса алифатических альдегидов эффективность их обнаружения снижается (Sawicki et al., 1961). С достаточно высокой чувствительностью и быстротой удается определять альдегиды, содержащие от 1 до 9 углеродных атомов (Paz et al., 1965).

если связь C8—C9 предварительно расщепляли периодатом. После расщепления количественно определяли образовавшийся формальдегид (Massamiri et al., 1978). Большинство обычных сахаров, содержащих пиранозо-гемиацетальные структуры, не реагирует с МБТГ. Однако некоторые сахара с фуранозной структурой при нагревании и низких значениях pH все же дают цветную реакцию с МБТГ.

В работе Савицкого и др. (Sawicki et al., 1961) не было исследовано влияние pH на взаимодействие МБТГ с соединениями, перечисленными в табл. 25-1. По данным других авторов (Paz et al., 1965), при использовании модифицированного ими варианта колориметрического метода Савицкого значение pH очень существенно сказывается на эффективности определения. Эти авторы утверждают, что pH следует поддерживать в диапазоне 3—4. При таких значениях pH компоненты буфера — ацетат, цитрат или фосфат — могут мешать проведению анализа лишь в концентрации выше 0,05 М, 0,05 М и 0,01М соответственно.

В 1971 г. в работе (Gochman, Schmitz, 1971) была описана методика количественного определения пероксида водорода по реакции окислительного сочетания МБТГ и ДМА с образованием индаминового красителя. Шаг вперед, сделанный авторами этой работы, заключался в том, что для разложения пероксида водорода они использовали не химические окислители, как в работе (Hunig, Fritsch, 1957), а фермент — пероксидазу хрена. Катализируемая пероксидазой реакция приводила к образованию того же водорастворимого голубого индаминового красителя.

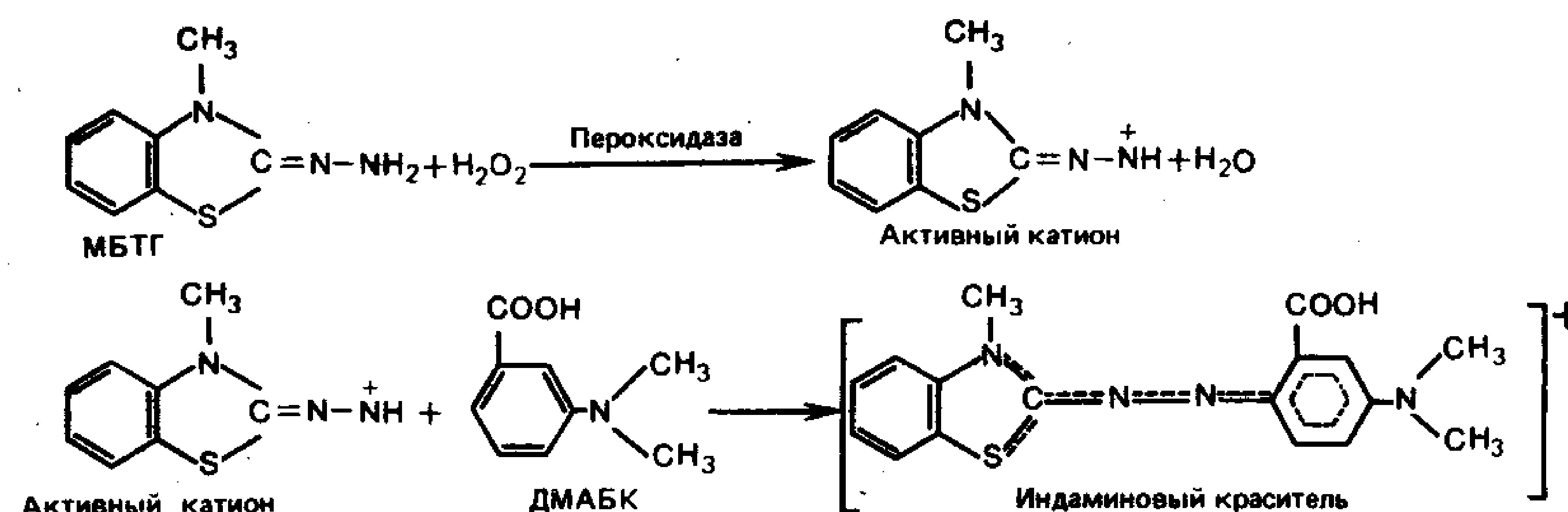


Рис. 25-3. Механизм образования индаминового красителя из МБТГ и ДМАБК (Ngo, Lenhoff, 1980).

Количество образующегося индаминового красителя пропорционально количеству пероксида водорода, возникающего при действии второго фермента системы, например уриказы или глюкозооксидазы, на подходящий субстрат — мочевую кислоту или глюкозу соответственно (Gochman, Schmitz, 1971, 1972). Поглощение в конечном итоге оказывается пропорциональным количеству субстрата. Важно, что определению практически не мешает присутствие таких восстанавливающих агентов, как аскорбиновая или гентизиновая кислота, которое может заметно сказываться на результатах определения в других методах анализа (Gochman, Schmitz, 1971, 1972).

В работе Нго и Ленхоффа (Ngo, Lenhoff, 1980) впервые в качестве партнера в реакции окислительного сочетания с активным катионом — производным МБТГ использовали 3-(диметиламино)бензойную кислоту (ДМАБК) (рис. 25-3). В отличие от ДМА, высокотоксичного вещества, малорастворимого в воде и обладающего крайне неприятным запахом, новый субстрат — ДМАБК — представляет собой нетоксичное хорошо растворимое в воде и лишенное резкого запаха вещество.

С помощью этого реагента удавалось обнаружить присутствие пероксидазы в концентрации до 2 фмоль/мл. Помимо определения пероксидазы эту реакцию можно использовать для обнаружения других ферментов, таких, как глюкозооксидаза или α-глюкозидаза, при действии которых образуется H_2O_2. В системе сопряжения ферментативных реакций этот крайне чувствительный метод тестирования можно расширить и на такие ферменты, как уриказа (Gochman, Schmitz, 1971), оксалатоксидаза (Obzansky, Richardson, 1983), путресциноксидаза (Wampler et al., 1979), гуаназа и ксантиноксидаза (Ando et al., 1983), трегалаза (Killick, Wang, 1980) и холиноксидаза (Capaldi, Taylor, 1983).

Джиохиган и др. (Geoghegan et al., 1983) подтвердили уровень чувствительности теста, о котором сообщалось в работе Нго и Ленхоффа (Ngo, Lenhoff, 1980), и ввели несколько мо-

дификаций, позволяющих 1) понизить фоновое окрашивание и светочувствительность, 2) блокировать действие каталазы, которая может присутствовать в тестируемых образцах, и 3) в любой момент останавливать реакцию. Это достигается благодаря 1) использованию цитратно-фосфатного буфера; 2) включению в реакционную смесь азида натрия и 3) снижению pH до 3,0 с помощью сильной кислоты.

Методы

Использовали 3-метил-2-бензотиазолингидразонгидрохлорид (МБТГ) и 3-(диметиламино)бензойную кислоту (ДМАБК) производства фирмы Aldrich. Необходимо отметить, что аббревиатуру ДМАБ часто применяют для обозначения других веществ, например *п*-(диметиламино)бензальдегида (реактив Эрлиха) или 4-(диметиламино)бензойной кислоты, которые не следует путать с используемой нами 3-(диметиламино)бензойной кислотой.

Все растворы готовили из реактивов высокого качества, во всех случаях (за исключением нескольких, специально отмеченных) исходные растворы готовили на цитратно-фосфатном буфере (ЦФБ), pH 7,0. Для получения буфера смешивали 120 мл 0,1 М лимонной кислоты и 500 мл 0,2 М Na_2HPO_4 и доводили объем водой до 1 л (McIlvaine, 1921). Выбор этого буфера был продиктован тем, что в его присутствии наблюдается значительное снижение спонтанного или индуцированного светом фонового окрашивания (рис. 25-4; Geoghegan et al., 1982, 1983).

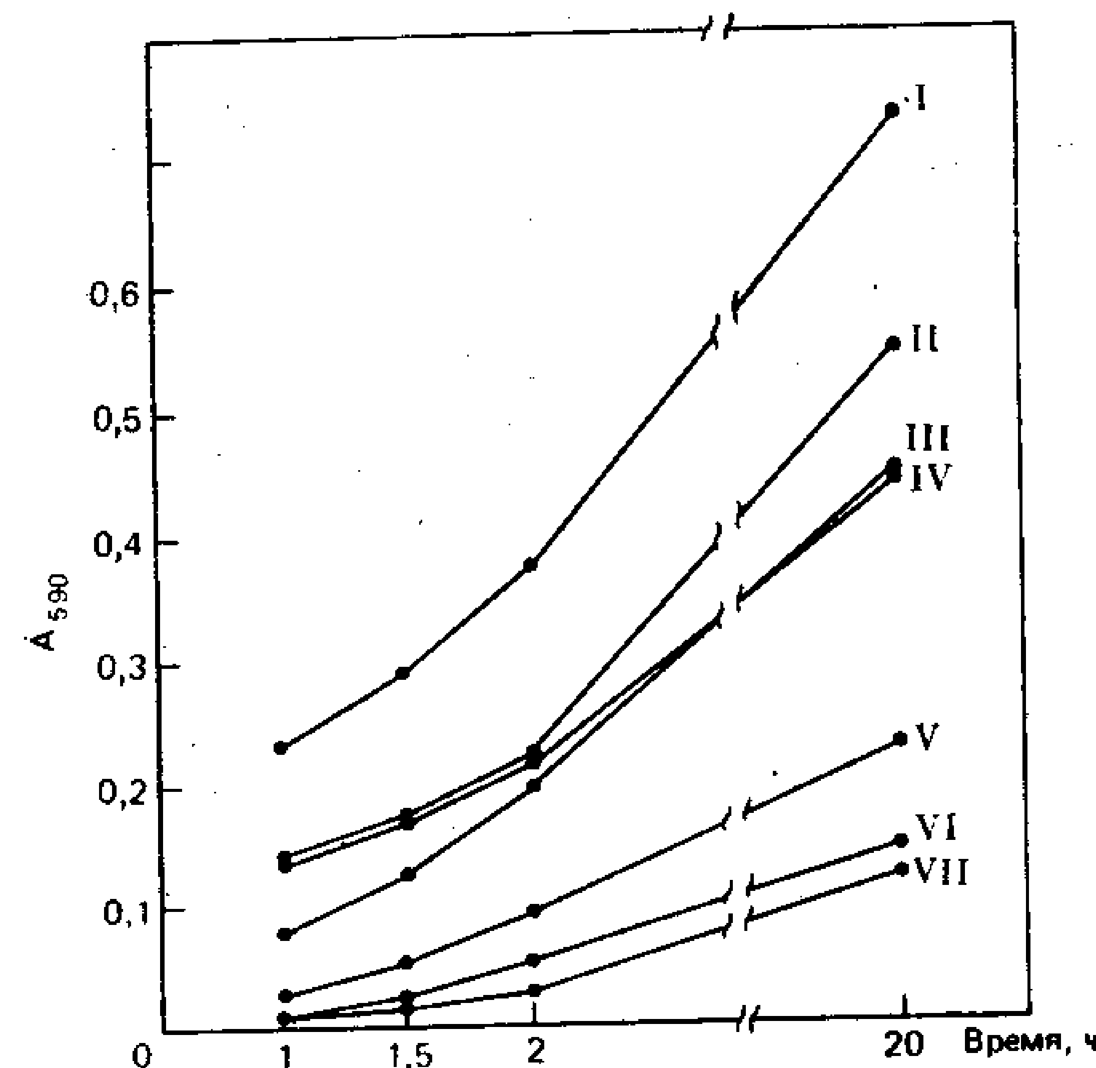


Рис. 25-4. Развитие окраски в «отрицательном контроле» в присутствии различных буферных компонентов: *I* — 0,01 трис-HCl, pH 7,2; *II* — 0,1 М трис-цитрат, pH 8,0; *III* — 0,1 М цитратно-фосфатный буфер, pH 7,0; *IV* — 0,1 трис-цитрат, pH 7,2; *V* — 0,1 М цитратно-фосфатный буфер, pH 6,0; *VI* — 0,1 М цитратно-фосфатный буфер; pH 5,0; *VII* — 0,1 М HEPES-буфер, pH 5,0.

Исходные растворы (3×10^{-2} М ДМАБК, $6\cdot10^{-4}$ М МБТГ (Ngo, Lenhoff, 1980) и 1,0 М NaN_3) готовили на ЦФБ и хранили в плотно закрытых темных бутылях при 4 °C. Смесь ДМАБК и МБТГ называют реактивом Нго — Ленхоффа. Отметим, что и ДМАБК, и МБТГ растворяются медленно. Не следует пользоваться пожелтевшими растворами. Не-

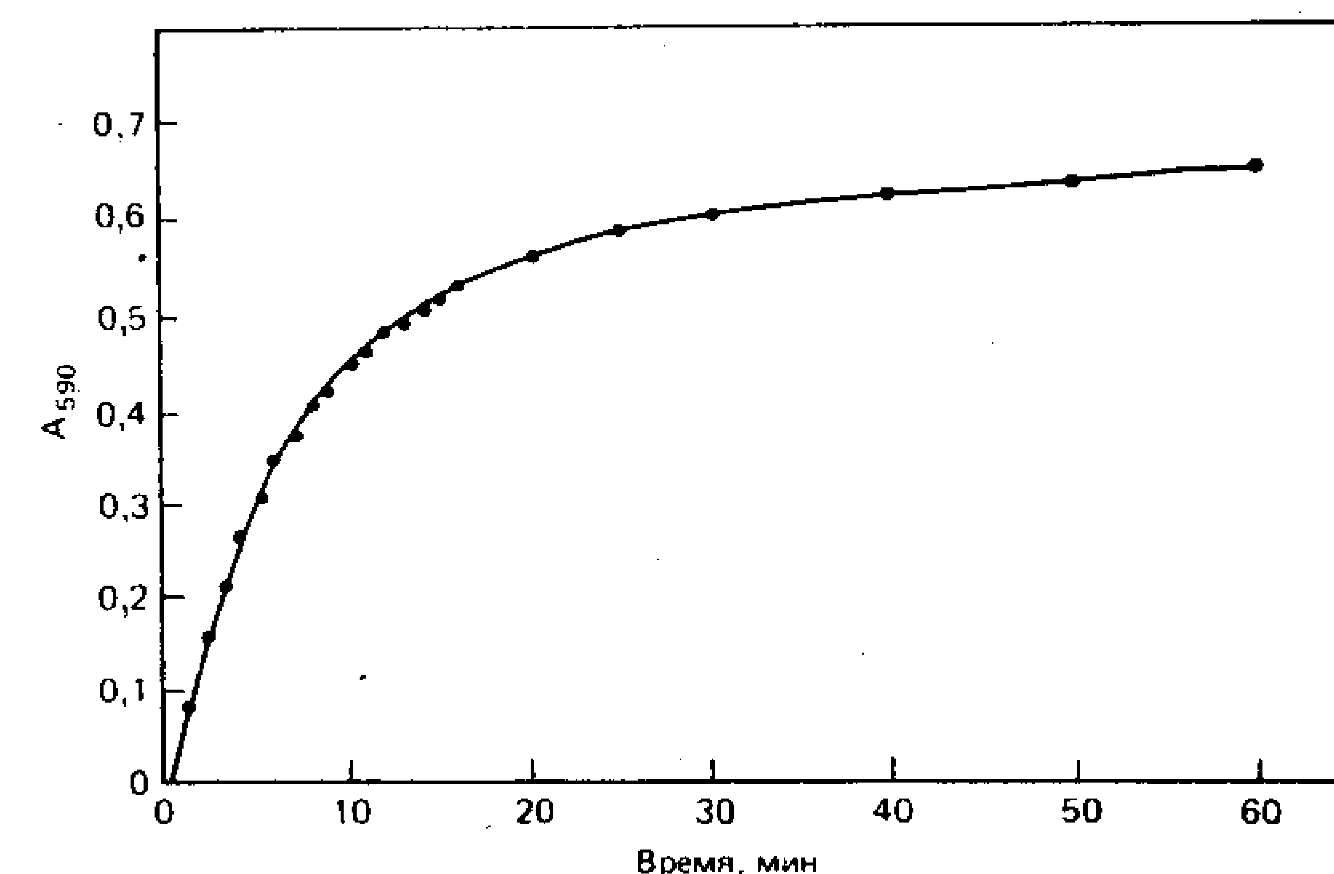


Рис. 25-5. Скорость развития окраски. В кювету двулучевого спектрофотометра Cary вносили 7 нг пероксидазы в 0,1 мл цитратно-фосфатного буфера. Реакция начиналась после добавления 0,9 мл реактива Нго—Ленхоффа. Во второй кювете находился реактив Нго—Ленхоффа без фермента.

посредственно перед использованием готовят рабочий раствор, смешивая 156 мл ЦФБ, 22 мл исходного раствора МБТГ, 22 мл исходного раствора ДМАБК, 0,24 мл 30%-ного H_2O_2 и 2 мл 1 М NaN_3. Полученную смесь осторожно перемешивают.

Образование индаминового красителя под действием пероксидазы и H_2O_2 продолжается до полного израсходования субстратов. Реакция протекает быстро. Развитие окраски замедляется по истечении первых десяти минут реакции (рис. 25-5). К этому моменту интенсивность окрашивания достигает 60% максимального значения (Geoghegan et al., 1983).

Пероксидазу на пикомолярном уровне (фмоль/мл) можно определять или в режиме фиксированного времени инкубации, или по скорости реакции. В рамках определенного временно́го интервала существует линейная зависимость между поглощением при 590 нм и концентрацией пероксидазы (Ngo, Lenhoff, 1980). Реакцию останавливают добавлением 1—3 н. HCl или H_2SO_4 до pH 2,9—3,1. При более низких значениях pH (0,06—1,7) наблюдается резкое снижение поглощения (на 20%). Для остановки реакции достаточно, например, к 0,9 мл реакционной смеси добавить 0,1 мл 1 н. H_2SO_4. Добавление серной или со-

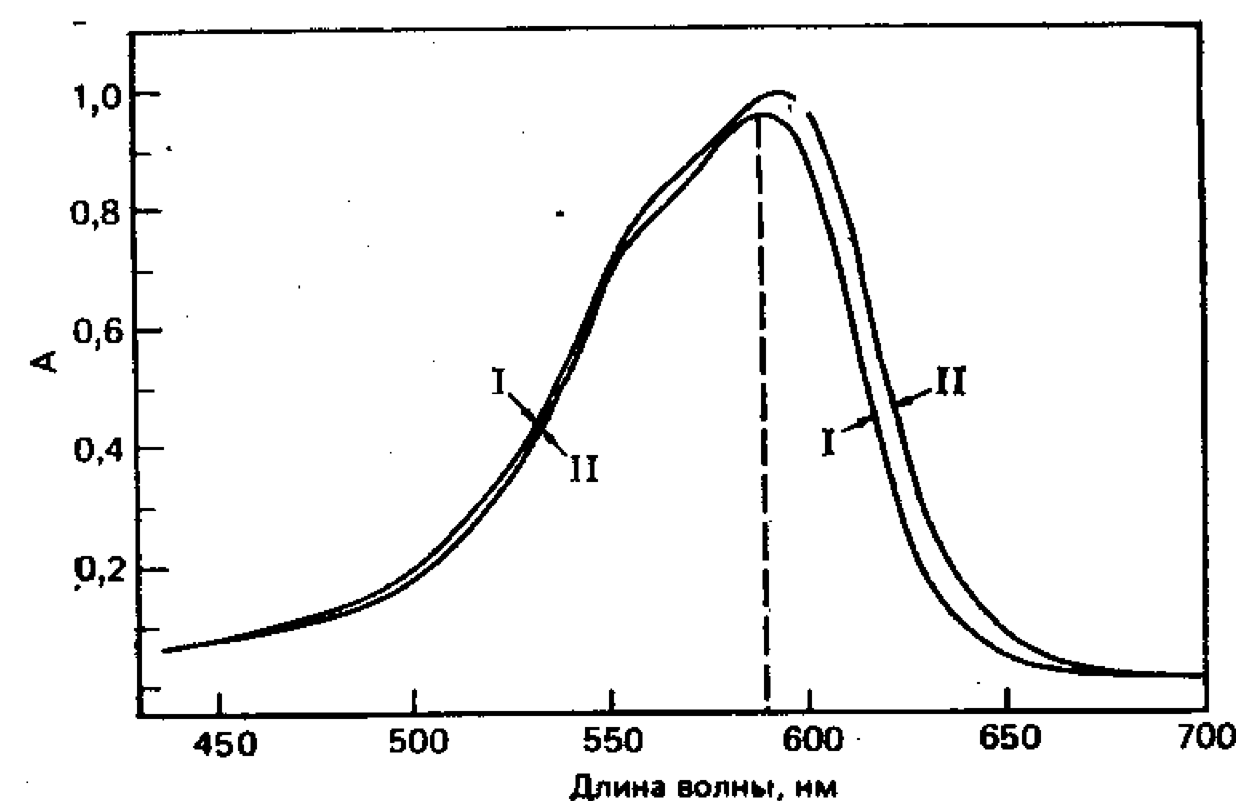


Рис. 25-6. Влияние понижения pH на спектр поглощения продукта ферментативной реакции: *I* — pH 7,0; *II* — pH 2,9. При добавлении как 1 н. HCl, так и 1 н. H_2SO_4 результаты были одинаковые. Штриховая линия соответствует 590 нм.

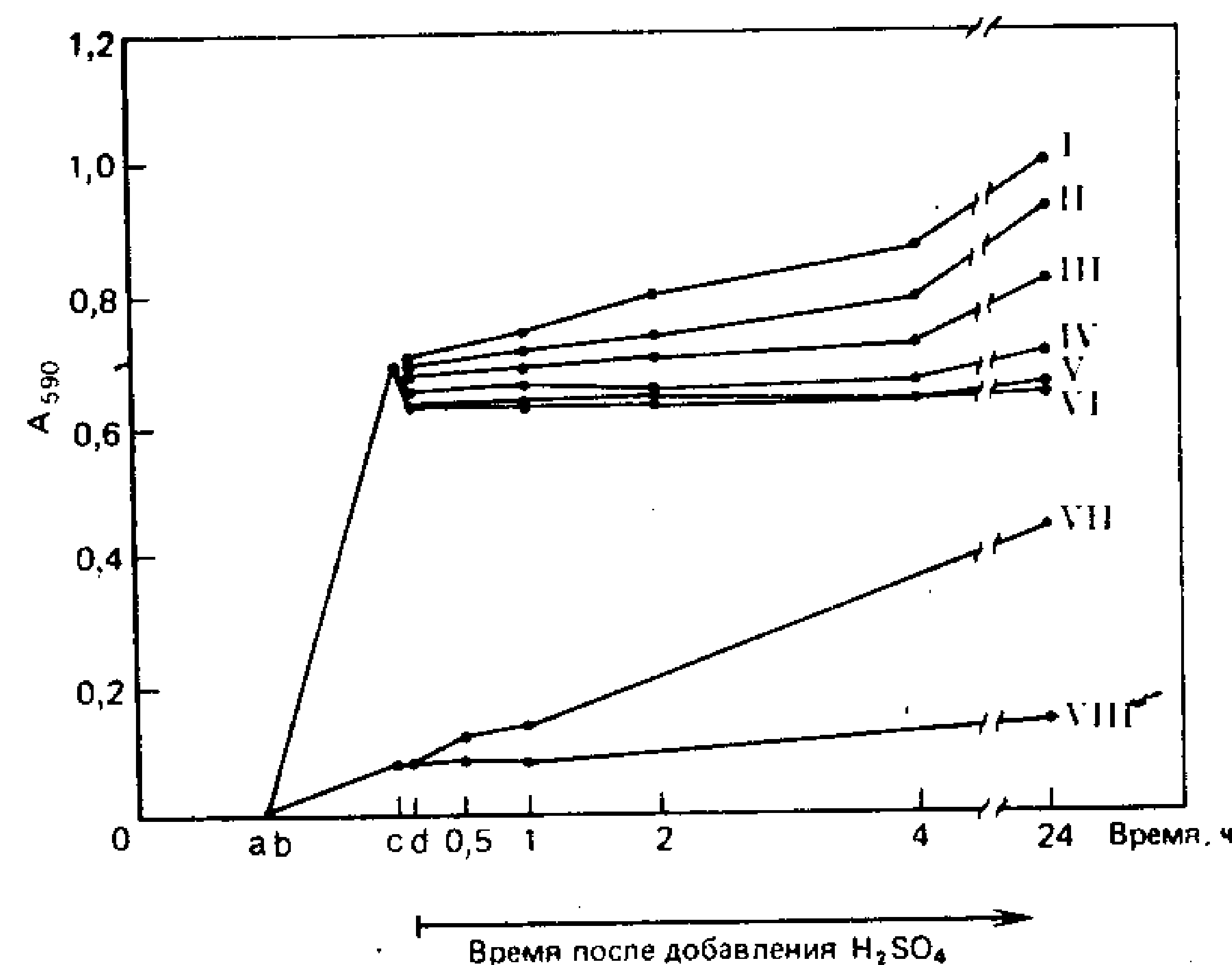


Рис. 25-7. Зависимость прекращения развития окраски от количества добавленной серной кислоты. К 1 мл реактива Нго—Ленхоффа (с пероксидазой или без пероксидазы) добавляли по 0,1 мл каждого из названных растворов. В присутствии пероксидазы: *I* — H_2O; *II* — 0,2 н. H_2SO_4; *III* — 0,5 н. H_2SO_4; *IV* — 1 н. H_2SO_4; *V* — 2 н. H_2SO_4; *VI* — 3 н. H_2SO_4. В отсутствие пероксидазы: *VII* — H_2O и *VIII* — 3 н. H_2SO_4. Буквы a, b, c и d соответствуют развитию поглощения в нулевой момент времени, после добавления всех реагентов, еще через 1 ч и сразу после добавления кислоты соответственно.

ляной кислоты вызывает остановку реакции и небольшое смещение максимума спектра поглощения от 590 нм при pH 7,0 до 595 нм при pH 1,0—3,0 (рис. 25-6). Это смещение визуально регистрируется как изменение окраски от фиолетово-синей до чисто голубой. Вслед за добавлением кислоты наблюдается снижение поглощения, которое соответствует происходящему разбавлению смеси. В течение последующих 4 ч дополнительного уменьшения поглощения не отмечали (рис. 25-7) (Geoghegan et al., 1983).

Удобнее всего измерять поглощение в слое жидкости толщиной 1 см. При работе с обычными платами для микротитрования (на 96 лунок) максимальный объем раствора в лунке не должен превышать 330 мкл. При этом уровень жидкости располагается чуть ниже плоской поверхности платы. Это необходимо для предотвращения заметного искривления поверхности жидкости в лунке и случайного смачивания сканирующего устройства. Реакцию в лунке можно проводить в объеме ~267 мкл, добавляя через необходимое время 33 мкл 1 н. HCl или H_2SO_4 для доведения pH до 3,0 и остановки реакции.

Приводимая ниже методика гетерогенного иммуноанализа в основной части практически полностью воспроизводит уже описанные методики (Engvall, 1980; Hay et al., 1976, 1979). Первичное покрытие поверхности лунок в плате создают, помещая в лунки по 267 мкл раствора антигена или антител (1—10 мкг/мл) и инкубируя 3 ч при 37 °C, а затем в течение ночи при 4 °C. Избыток несвязавшегося белка удаляют, трижды промывают лунки и обрабатывают раствором БСА для блокирования остаточных центров сорбции. Важно отметить, что препарат БСА должен быть свободен от примесей таких белков, как гемоглобин, каталаза, цитохромы и билирубин (Perlstein et al., 1977, 1978), которые могут взаимодействовать с H_2O_2 и искажать результаты анализа. Недавно было предложено в качестве агента, блокирующего центры сорбции после переноса белков на нитроцеллюлозу, использовать желатину (Saravis, 1984). Присутствие желатины никак не сказывается на протекании реакции в сопряженной системе определения пероксидазы. Использовали жидкий препарат желатины (мол. масса в среднем ~60 000) из рыбьей чешуи, который в качестве консервантов, не мешающих проведению анализа, содержал метил- и пропил-*п*-гидроксибензоат. По завершении стадии блокирования (или насыщения избыточных сорбционных центров) платы промывают раствором ФСБ-Т и высушивают.

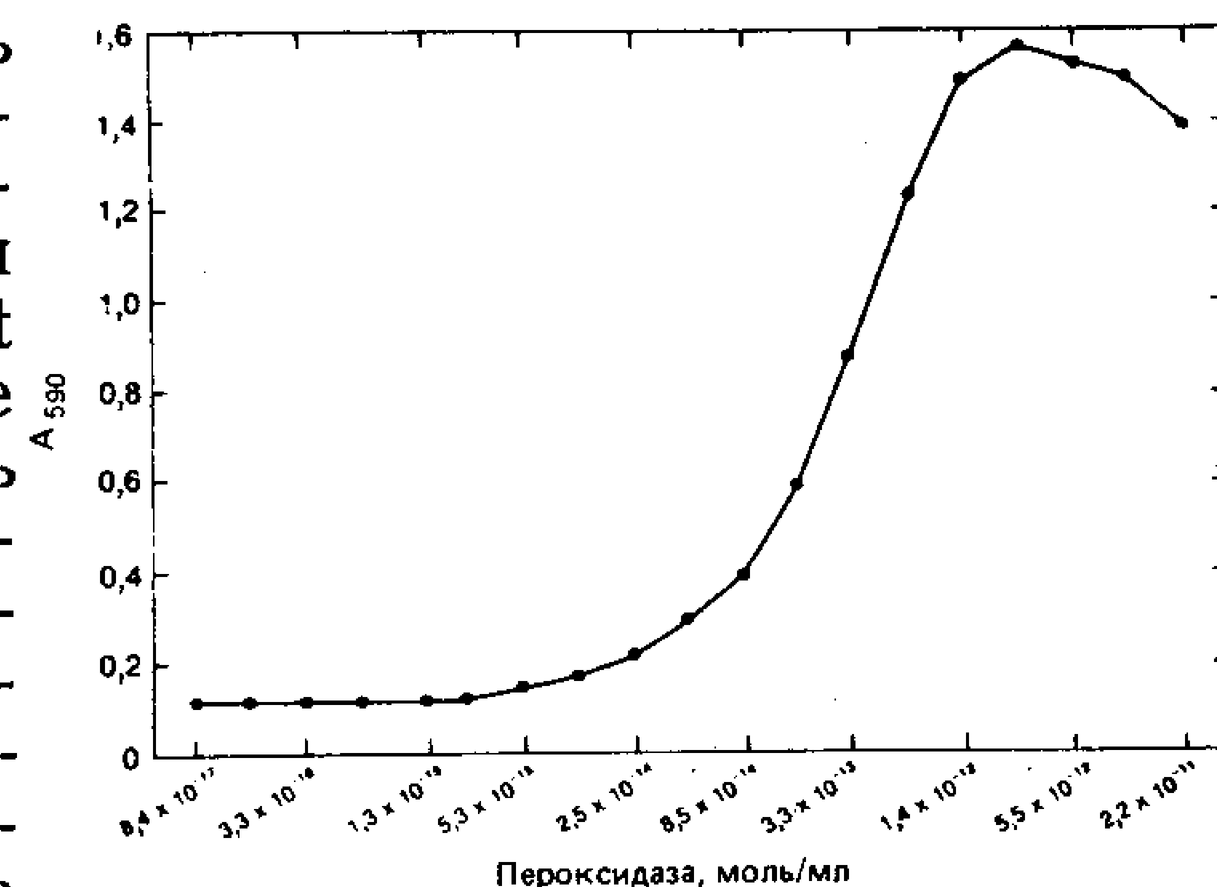


Рис. 25-8. Пределы чувствительности определения пероксидазы с помощью реактива Нго—Ленхоффа.

Инкубацию с анализируемыми образцами обычно проводят в течение 1 ч при 37 °C и 30 мин при 4 °C. Лунки трижды промывают раствором ФСБ-Т. Добавляют раствор антител, конъюгированных с ПХ, инкубируют и промывают так же, как и на стадии инкубации с образцом. Вслед за этим в лунки добавляют по 267 мкл реактива Нго — Ленхоффа и инкубируют в течение подобранного фиксированного интервала времени (обычно 30 мин или 1 ч). Останавливают реакцию, добавляя 33 мкл кислоты, и измеряют поглощение при 595 нм. Полученные значения сравнивают с калибровочной кривой (рис. 25-8).

По данным Нго и Ленхоффа (Ngo, Lenhoff, 1980), использование системы окрашивания МБТГ — ДМАБК позволяло с хорошей достоверностью и точностью определять концентрацию глюкозы. Значение коэффициента вариации составляло ~4,4%. При этом значения концентрации глюкозы, рассчитанные по скорости реакции, составляли в среднем около 98,5%, а значения, определенные в варианте фиксированного времени реакции, 101% от истинных значений. При определении активности пероксидазы среднее стандартное отклонение при измерении поглощения составляет ±0,008 (сравнение данных трех серий измерений; Geoghegan, неопубликованные результаты).

Вещества, мешающие определению

При использовании гетерогенного метода ELISA на ход анализа влияют лишь немногие компоненты тестируемых образцов сыворотки, спинномозговой жидкости или мочи. Это обусловлено тем, что до стадии окрашивания все эти компоненты удаляются и отмываются с поверхности платы. В то же время применение пероксидазы в системах сопряженных реакций вместе с еще одним ферментом, например глюкозооксидазой (катализирующей образование H_2O_2 из глюкозы), связано с необходимостью контакта анализируемого образца и окрашивающих реагентов. В этом случае следует учитывать возможное влияние на ход анализа примесных компонентов образца.

Каталаза присутствует практически в любых тканях млекопитающих. Присутствуя в ходе анализа, она может активно конкурировать с ПХ за субстрат — H_2O_2. Каталаза присутствует также в сыворотке и эритроцитах (Deisseroth, Dounce, 1969). Ее добавление к реактиву Нго — Ленхоффа при рН 7,0 препятствует развитию окраски (Geoghegan et al., 1983). Ее присутствие в реакционной смеси заметно подавляет процесс образования красителя, направляемый пероксидазой. Азид натрия ингибирует каталазу, не оказывая существенного воздействия на ПХ при рН 7,5 (Lenhoff, Kaplan, 1955) и практически не влияя на активность ПХ при рН 7,0 (Geoghegan et al., 1983). Целесообразно включать азид в состав буфера даже тогда, когда нет непосредственных оснований ожидать присутствия каталазы в образце.

В некоторых системах определения глюкозы, основанных на применении пероксидазы, присутствие аскорбиновой кислоты приводит к занижению результатов анализа (White-Stevens, Stover, 1982). Занижение результата на величину в пределах 3—5 мг/100 мл наблюдается при концентрации аскорбиновой кислоты около 10 мг/100 мл, т. е. концентрации выше физиологической (Gochman, Schmitz, 1972). В работе (White-Stevens, Stover, 1982) высказывается предположение о том, что в системах на основе МБТГ пероксидаза в сочетании с H_2O_2 катализирует окислительное превращение МБТГ в активную форму — $МБТГ_{окисл}$. Это приводит к тому, что в продолжение некоторого временнóго интервала наблюдается пониженная скорость развития окраски.

В некоторых системах, например с применением *о*-толуидина, после добавления аскорбиновой кислоты наблюдается понижение интенсивности уже сформировавшейся окраски (White-Stevens, Stover, 1982). Поскольку в результате окислительного сочетания МБТГ ковалентно связывается с ДМАБК, образование индаминового красителя является необратимым процессом.

Хотя аскорбат в высокой концентрации и препятствует использованию метода, основанного на определении скорости реакции, его присутствие не мешает проводить измерения в режиме фиксированного времени инкубации с МБТГ и ДМАБК (Ngo, Lenhoff, 1980). При определении глюкозы в этом режиме для последующих достоверных измерений поглощения анализируемую сыворотку приходится существенно разводить. При этом концентрация аскорбата снижается до такой степени, что он перестает мешать определению глюкозы. Более того, было показано, что аскорбиновая кислота довольно быстро разрушается, что также снижает вероятность искажения результатов подобного анализа (Gochman, Schmitz, 1971).

В кислой среде МБТГ может реагировать с рядом соединений (табл. 25-1). Так, при определении пероксидазы по методу Капалди и Тейлора (Capaldi, Taylor, 1983) развитие окраски достигается за счет взаимодействия МБТГ с его формальдегидно-азиновым производным. Важнейшее преимущество метода Нго — Ленхоффа заключается в том, что реакция в системе МБТГ — ДМАБК протекает в нейтральной среде. При рН 7,0 реакции с альдегидами и другими веществами практически не идут. Следует, однако, избегать присутствия в системе дополнительных окислителей типа тетраацетата свинца(IV) или хлорида железа(III), которые могут завышать результаты анализа (Sawicki et al., 1961).

Обсуждение

В работе Артисса и др. (Artiss et al., 1981) отмечается, что сочетание МБТГ как с ароматическими аминами, так и с ароматическими спиртами в практическом отношении не является особенно выгодным. Такая оценка основана на опытах авторов по взаимодействию МБТГ лишь с тремя реагентами: N,N-диметиланилингидрохлоридом (ДМА), N,N-диэтиланилингидрохлоридом (ДЭА) и 2-гидрокси-3,5-дихлорбензосульфонатом натрия (ГДХБС). Реакции проводили при рН 7,8 и 37 °С. Было установлено, что уже через 30 мин инкубации наблюдается сильное фоновое окрашивание — поглощение в контроле достигает 1,0 для ДЭА и 0,8 для ГДХБС. Для правильной оценки этих результатов следует учитывать следующие обстоятельства: 1) по данным (Gochman, Schmitz, 1971, 1972), для системы МБТГ — ДМА в фосфатном буфере характерен рН-оптимум 4,2; 2) по данным (Geoghegan et al., 1982, 1983), в системе МБТГ — ДМАБК фоновое окрашивание (в контроле) заметно ослабляется с понижением рН. Так, удовлетворительное поглощение в контроле (менее 0,1 после 1 ч инкубации) наблюдается при работе в 0,1 М цитратно-фосфатном буфере, рН 7,0 или в 0,1 М HEPES-буфере, рН 7,0.

Вопросы, связанные с влиянием pH и состава буферных растворов, детально не изучались. Частично избавиться от возникающих в этой связи проблем [о которых говорится в работе Артисса и др. (Artiss et al., 1981)] удавалось, используя для образования пероксида холиноксидазу при pH 7,8 и понижая pH до 3,5 для проведения этапа окислительного сочетания МБТГ с его формальдегид-азиновым производным (Capaldi, Taylor, 1983). При сравнении влияния добавок цитрата к ряду буферных систем было показано (Geoghegan et al., 1983), что в буфере трис-HCl, pH 7,2, наблюдается заметное фоновое окрашивание, которое в трис-цитратном буфере снижается на 50% даже при pH 8,0.

Систематического исследования влияния состава буфера на стабильность пероксидазы не проводилось. Известно лишь (Bovaird et al., 1982), что активность ПХ заметно убывает при хранении в фосфатном буфере, pH 5,0 при 25 °C. Из всех проверенных буферных растворов оптимальным был признан цитратный. Наиболее высокая пероксидазная активность наблюдалась в 20 мМ цитратном буфере, pH 7,0. Повышение молярности буфера до 100 мМ приводило к падению активности при pH 7,0 примерно на 20%. Существенное падение активности фермента наблюдалось также при pH выше 8 и ниже 7 в цитратном буфере. В фосфатном буфере оптимальным для пероксидазы является pH 6,0. Как в более щелочной, так и в более кислой области активность ПХ заметно убывает. Влияние состава буфера наиболее отчетливо проявляется при низких концентрациях фермента. При концентрации ПХ выше 1,25 нмоль/л падение активности с изменением pH происходит в значительно меньшей степени.

С учетом совместного влияния pH и состава буферного раствора на активность ПХ для проведения анализа, вероятно, следует выбрать цитратный буфер с низкой молярностью и pH 7—8. В методе Нго — Ленхоффа МБТГ и ДМАБК взаимодействуют при оптимальном значении pH 7,0 в фосфатном или цитратно-фосфатном буфере (Ngo, Lenhoff, 1980; Geoghegan et al., 1983). По-видимому следует совсем исключить фосфат из состава цитратно-фосфатного буфера и заменить его на какой-либо другой компонент, не влияющий на активность ПХ.

Молярную экстинкцию красителя можно увеличить, останавливая реакцию ацетоном. При pH 1—4 ацетон мешает развитию окраски (Sawicki et al., 1961; Paz et al., 1965). Это обусловлено взаимодействием МБТГ с ацетоном, которое протекает легко и приводит к образованию бесцветного продукта, поглощающего при 297 и 310 нм (Paz et al., 1965). Во избежание нежелательных взаимодействий необходимо, чтобы посуда для приготовления и хранения реактивов была совершенно лишена следов ацетона. Есть сообщение (Capaldi, Taylor, 1983), что при остановке

реакции сочетания МБТГ с азиновым производным МБТГ при pH 3,5 ацетоном наблюдаемое поглощение оказывается выше, чем при остановке реакции HCl. Для использования этого явления в сочетании с реакцией Нго — Ленхоффа, вероятно, целесообразно использовать подкисленный ацетон. Оптимальные условия, которые могли бы одновременно обеспечить эффективную остановку реакции и усиление окрашивания, еще не подобраны. Предварительные анализы свидетельствуют о том, что некоторые типы плат для микротитрования устойчивы к обработке водным ацетоном в концентрационном диапазоне 50—75%. В чистом ацетоне платы разрушаются.

В заключение отметим, что вопреки мнению, высказанному в работе Артисса и др. (Artiss et al., 1981), продолжающееся изучение возможностей использования МБТГ дает определенные плоды. Это подтверждается успешным применением системы определения пероксидазы с помощью реактива Нго — Ленхоффа (МБТГ — ДМАБК) для проведения гетерофазного анализа методом ELISA (Geoghegan et al., 1983).

Литература

Ando T., Muraoka T., Okuda H. (1983). A sensitive spectrophotometric assay for guanase activity, Anal. Biochem., **130**, 295—301.

Artiss J. D., Thibert R. J., McIntosh J. M., Zak B. (1981). Study of various substrates for peroxidase-coupled oxidations, Microchem. J., **26**, 487—505.

Bovaird J. H., Ngo T. T., Lenhoff H. M. (1982). Optimizing the O-phenylenediamine assay for horseradish peroxidase: effects of phosphate and pH, substrate and enzyme concentrations and stopping reagents, Clin. Chem., **28**, 2423—2426.

Capaldi D. J., Taylor K. E. (1983). A new peroxidase color reaction: oxidative coupling of 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH) with its formaldehyde azine. Application to glucose and choline oxidases, Anal. Biochem., **129**, 329—336.

Cary R. N., Feldbruegge D., Westgard J. O. (1974). Evaluation of the adaptation of the glucose oxidase/peroxidase-3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone-N,N-dimethylaniline procedure to the technicon "SMA 12/60" and comparison with other automated methods for glucose, Clin. Chem., **20**, 595—602.

Deisseroth A., Dounce A. L. (1969). The purification and crystallization of beef erythrocyte catalase, Arch. Biochem. Biophys., **131**, 18—29.

Engvall E., 1980. Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. In: Methods in Enzymology (Van Vunakis H. and Langone J. J., eds.), Academic Press, New York, Vol. 70.

Geoghegan W. D., Struve M. F., Jordon R. E. (1982). Adaptation of the Ngo — Lenhoff peroxidase assay for ELISA, Fed. Proc., **41**, 792 (abstract).

Geoghegan W. D., Struve M. F., Jordon R. E. (1983). Adaptation of the Ngo — Lenhoff peroxidase assay for solid phase ELISA, J. Immunol. Methods, **60**, 61—68.

Gochman N., Schmitz J. M. (1971). Automated determination of uric acid with use of a uricase-peroxidase system, Clin. Chem., **17**, 1154—1159.

Gochman N., Schmitz J. M. (1972). Application of a new peroxidase indicator reaction to the specific, automated determination of a glucose with glucose oxidase, Clin. Chem., **18**, 943—950.

Hay F. C., Nineham L. J., Roitt I. M. (1976). Routine assay for the detection of immune complexes of known immunoglobulin class using solid phase Clq., Clin. Exp. Immunol., **24**, 396—400.
Hay F. C., Nineham L. J., Perumal R., Roitt I. M. (1979). Intraarticular and circulating immune complexes and antiglobulins (IgG and IgM) in rheumatoid arthritis: correlation with clinical features, Ann. Rheum. Dis., **38**, 1—7.
Honda S., Nishimura Y., Chiba H., Kakehi K. (1981). Determination of carbohydrates by codensation with 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone, Anal. Chim. Acta, **131**, 293—296.
Hunig S., Fritsch K. H. (1957). Azofarbstoffe durch oxydative kupplung I farbstoffe aus N-methyl-benzthiazolon-hydrazon justus liebigs, Ann. Der. Chemie, **609**, 143—160.
Hunig S. (1962). Heterocyclic azo dyes by oxidative coupling, Angew. Chem. Internat. Edit., **1**, 640—646.
Killick K., Wang L. W. (1980). The localization of trehalase in polyacrylamide gels with eugenol by a coupled enzyme assay, Anal. Biochem., **106**, 367—372.
Massamiri Y., Beljean M., Durand G., Feger J., Pays M., Agneray J. (1978). Colorimetric assay of sialic acid by a methyl-3-benzothiazolinone-2-hydrazone reactants, Anal. Biochem., **91**, 618—625.
Lenhoff H. M., Kaplan N. O., 1955. Cytochrome C and cytochrome C peroxidase from pseudomonas fluorescens. In: Method in Enzymology (Colowick S., and N. Kaplan, eds.) Academic Press, New York, Vol. 2, p. 758—764.
McIlvaine T. C. (1921). A buffer solution for colorimetric comparison, J. Biol. Chem., **49**, 183—186.
Ngo T. T., Lenhoff H. M. (1980). A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions, Anal. Biochem., **105**, 389—397.
Obzansky D. M., Richrdson K. E. (1983). Quantification of urinary oxalate with oxalate oxidase from beet stems, Clin. Chem., **29**, 1815—1819.
Paz M. A., Blumenfeld O. O., Rojkind M., Henson E., Furfine C., Gallop P. M. (1965). Determination of carbonyl compounds with N-methyl benthiazolone hydrazone, Arch. Biochem. Biophys., **109**, 548—559.
Perlstein M. T., Thibert R. J., Zak B. (1977). Bilirubin and hemoglobin interferences in direct colorimetric cholesterol reactions using en enzyme reagents, Microchem. J., **22**, 403—419.
Perlstein M. T., Thibert R. J., Watkins R., Zak B. (1978). Spectrophotometric study of bilirubin and hemoglobin interactions in several hydrogen peroxide generating procedures, Microchem. J., **23**, 13—27.
Saravis C. A. (1984). Improved blocking of nonspecific antibody binding sites on nitrocellulose membranes, Electrophoresis, **5**, 54—55.
Sawicki E., Hauser T. R., Stanley T. W., Elbert W. (1961). The 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone test, Anal. Chem., **33**, 93—96.
Sawicki E., Schumacher R., Engel C. R. (1967). Comparison of MBTH and other methods for the determination of sugars and other α-glycolic derivatives, Microchem. J., **12**, 377—395.
Smith R. L., Gilkerson E. (1979). Quantitation of glycosaminoglycan hexoamine using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrozone hydrochloride, Anal. Biochem., **98**, 478—480.
Wampler J. E., Mulkerrin M. G., Rich E. S. (1979). Instrumentation and techniques for analysis of hydrogen peroxide and peroxide-producing reactions involving earthworm (diplocardia longa) bioluminescence Clin. Chem., **25**, 1628—1634.
White-Stevens R. H., Stover L. R. (1982). Interference by ascorbic acid in test systems involving peroxidase. II. Redox-coupled indicator systems, Clin. Chem., **28**, 589—595.

Глава 26

Иммунопероксидазные методы с использованием системы авидин — биотин

Су-Минг Хсу

Введение

Несмотря на то что первые разработки в области иммунофлуоресцентного анализа появились уже в 60-х годах, широкое признание иммунофлуоресцентные методы получили лишь в последующее десятилетие, когда стало ясно, что они буквально незаменимы для решения целого ряда актуальных проблем экспериментальной иммунологии. Иммунофлуоресцентный анализ нашел широкое применение в клинических исследованиях для обнаружения поверхностных и внутриклеточных лимфоцитных маркеров и иммунокомплексов при гломерулярных заболеваниях. В последние 15 лет был разработан еще один метод иммуноанализа, основанный на применении антител, конъюгированных с индикаторным ферментом. Этот метод благодаря его простоте и эффективности, в частности при анализе срезов тканей (обработанных формалином и покрытых слоем парафина), быстро вытесняет иммунофлуоресцентные методы анализа. Несмотря на то что для мечения антител использовалось множество различных ферментов, в последнее время в качестве индикаторного фермента в состав конъюгатов вводят, как правило, пероксидазу хрена. Количество специфических антигенов в тканевых срезах обычно определяют полуколичественно по интенсивности окрашивания с использованием серии разведений препарата антител (Hsu et al., 1981a, b). Иммунопероксидазные методы нашли применение и в других гетерофазных системах анализа, таких, как ИФА и метод обнаружения антигенов на блотах — после электрофоретического разделения или переноса из геля на матрицу типа нитроцеллюлозы (Azen, Yu, 1984; Madri, Barwick, 1983; Rosenkoetter et al., 1984). Количественное определение антигенов осуществляется с помощью спектрофотометрического измерения концентрации окрашенного продукта индикаторной ферментативной реакции (Madri, Barwick, 1983).

В настоящей статье рассматриваются подходы к локализации антигенов в тканевых срезах, а также в других гетерофазных системах, основанные на применении специфического взаимодействия в системе авидин — биотин (см. обзоры Bayer, Wilcheck, 1980; Hsu, Raine, 1983). Авидин представляет собой гликопротеин яичного белка (мол. масса 68 000), обладающий чрезвычайно высоким сродством к небольшим молекулам витамина биотина. В начале 60-х годов авидин использовали для харак-

теристики биотин-зависимых ферментов. В последние 15 лет вещества, меченные биотином, нашли широкое применение при решении различных проблем клеточной биохимии. Так, меченные биотином инсулин и адренокортикотропный гормон (АКТГ) были использованы для выделения и очистки специфических рецепторов (Hofmann, Kiso, 1976; Hofmann et al., 1977). В 1979 г. систему взаимодействий авидин — биотин было предложено использовать и в иммуногистохимии (Guesdon et al., 1979). Однако в качестве специфического и чувствительного гистохимического теста метод, основанный на применении этой системы, был признан лишь после его детальной разработки и проверки (Hsu et al., 1981a, b).

Применение методов на основе авидин-биотиновой системы

Важнейшее преимущество методов анализа, основанных на применении авидин-биотиновой системы, заключается в том, что любое вещество, конъюгированное с биотином, можно обнаружить по взаимодействию с авидином. В отличие от других иммунологических методов для этого метода использование взаимодействий антиген — антитело не обязательно. Приведем несколько примеров:

1. Гормоны, меченные биотином, можно использовать для обнаружения соответствующих рецепторов (Hofmann et al., 1977).
2. Токсины, меченные биотином, могут быть использованы для обнаружения токсиновых рецепторов.
3. Лектины, меченные биотином, могут быть использованы для обнаружения лектиновых рецепторов или специфических гликоконъюгатов (Hsu et al., 1982 a, c, d, e).
4. С помощью инъекции лектинов, меченных биотином, внутрь аксона можно исследовать направленный транспорт.
5. Меченную биотином вирусную ДНК можно использовать для локализации вирусного генома с помощью гибридизации in situ (Myerson et al., 1984).

Любые вещества, меченные биотином, включая и иммуноглобулины, могут быть обнаружены с помощью авидина, ковалентно или нековалентно связанного с тем или иным индикатором. В зависимости от системы обнаружения индикаторным компонентом могут служить красители — сульфородамин, флуоресцеин, родамин, а также ферритин, коллоидное золото; ферменты — пероксидаза, щелочная фосфатаза и др. Таким образом, авидин-биотиновая система может быть использована в самых разнообразных методах анализа, включая иммуногистохимические и электронно-микроскопические, методы обнаружения антигенов на блотах и в режиме ELISA, методы проточной цитофотометрии, скрининга гибридом и ДНК-гибридизации in situ. Во всех названных случаях используются сходные экспериментальные приемы, связанные с использованием авидин-биотиновой системы. Мы обсудим в деталях применение этой системы лишь при иммуногистохимическом анализе. Те же принципы приложимы и для других вариантов анализа.

Принципы, лежащие в основе авидин-биотиновой системы

Можно использовать одну из трех основных разновидностей системы авидин — биотин: 1) меченый авидин — биотин (МАБ-метод), 2) авидин-биотиновый мостик (АБМ-метод) и 3) авидин-биотиновый комплекс (АБК-метод). В рамках МАБ-метода вещество, меченное биотином, непосредственно обнаруживают по взаимодействию с авидиновым конъюгатом типа [авидин — флуоресцеин] или [авидин — пероксидаза]. Хотя использование авидин-пероксидазного конъюгата обеспечивает достаточно высокую чувствительность определения, следует отметить и существенный недостаток этого метода — высокий уровень фона и неспецифическое окрашивание тканей некоторых типов, в частности почечных тканей.

В АБМ-методе авидин используется в роли мостика между двумя или более молекулами биотинсодержащего конъюгата типа [биотин — антитела] или [биотин — пероксидаза]. Этот метод основан на том, что авидин содержит четыре центра связывания биотина. Теоретически он должен характеризоваться более высокой чувствительностью, чем МАБ-метод, благодаря возможному усилению в системе взаимодействий биотин — авидин — биотин. Молекулы авидина, связывающиеся с конъюгатом [антитела — биотин], вообще говоря, могли бы связать еще 2—3 молекулы биотинилированной пероксидазы. Однако по нашим наблюдениям при практическом использовании АБМ-метода теоретически ожидаемый уровень чувствительности не достигается (Hsu, Raine, Fanger, 1981b). Возможно, в первую очередь это обусловлено возникающими пространственными затруднениями.

Анализ тканевых срезов с помощью МАБ-метода

Ниже перечислены этапы проведения анализа для обнаружения рецептора агглютинина из земляного ореха в тканевых срезах (обработанных формалином и покрытых слоем парафина) с помощью МАБ-метода:

1. Удаление парафина и регидратацию срезов проводят с помощью обработки ксилолом, спиртом и краткой промывки дистиллированной водой.

2. Промывают срезы в 0,05 М трис-солевом буфере (ТСБ), pH 7,6.
3. Срезы помещают в ТСБ, содержащий 0,1% (по весу) препарата ацетонового порошка из мышиной печени, на 5 мин.
4. Быстро промывают ТСБ.
5. Инкубируют с препаратом агглютинина из земляного ореха, меченного биотином, при концентрации 50 мкг/мл в течение 1 ч.
6. Промывают ТСБ в течение 5 мин.
7. Инкубируют с конъюгатом [авидин — пероксидаза] (Vector Labs) в концентрации 25 мкг/мл в течение 30 мин.
8. Промывают ТСБ в течение 5 мин.
9. Проявляют в растворе субстрата, например в смеси H_2O_2 — диаминобензидин (см. ниже) — в течение ~5 мин.
10. Промывают ТСБ в течение 5 мин.
11. Дегидратируют поэтапной обработкой спиртом и ксилолом.
12. Получают готовые гистологические препараты.

Анализ тканевых срезов с помощью АБМ-метода

Ниже приведены этапы проведения анализа для обнаружения инсулинсекретирующих клеток поджелудочной железы:

1. Удаляют слой парафина и проводят регидратацию срезов обычным способом.
2. Промывают 5 мин в ТСБ.
3. Инкубируют 5 мин в 1%-ной нормальной кроличьей сыворотке, приготовленной на ТСБ.
4. Инкубируют 30 мин с антисывороткой морской свинки против инсулина в разведении 1:200.
5. Промывают 5 мин в ТСБ.
6. Инкубируют 30 мин с кроличьими антителами против иммуноглобулинов морской свинки в разведении 1:200.
7. Промывают 30 мин в ТСБ.
8. Инкубируют 30 мин в растворе, содержащем 10 мкг/мл авидина (Vector Labs).
9. Промывают 5 мин в ТСБ.
10. Инкубируют в растворе, содержащем 10 мкг/мл конъюгата [биотин — пероксидаза] (Vector Labs) в течение 30 мин.
11. Промывают 5 мин в ТСБ.
12. Проявляют в растворе, содержащем перекись водорода и диаминобензидин, в течение ~5 мин.
13. Промывают 5 мин в ТСБ.
14. Дегидратируют поэтапной обработкой спиртом и ксилолом.
15. Получают готовые гистологические препараты.

Основы метода АБК

С целью повысить чувствительность анализа мы разработали метод, основанный на применении комплекса [авидин — биотин — пероксидаза] (АБК-метод). Тот же принцип был положен в основу разработанных недавно вариантов АБК-метода с применением комплексов [авидин — биотин — щелочная фосфатаза] и [авидин — биотин — глюкозооксидаза]. Образование названных комплексов в АБК-методе обеспечивается следующими биохимическими характеристиками авидина и биотинсодержащих конъюгатов:

1. Авидин содержит четыре центра связывания биотина и соответствующих конъюгатов. Поэтому авидин может образовать мостик между по крайней мере двумя или более молекулами биотинсодержащего конъюгата.

2. К одной молекуле пероксидазы можно присоединить большое количество биотиновых молекул. Поэтому одна молекула конъюгата [биотин — пероксидаза] может взаимодействовать с несколькими молекулами авидина.

3. При правильном соотношении количеств авидина и биотинилированной пероксидазы возможно образование комплекса, содержащего много молекул пероксидазы.

4. Более высокое содержание пероксидазы в комплексе должно приводить к повышению чувствительности метода регистрации.

Подходящее соотношение авидина и конъюгата [биотин — пероксидаза] следует подбирать эмпирически. На чувствительности анализа в значительной степени может сказываться степень биотинилирования пероксидазы. Высококачественные компоненты для АБК-системы поставляет фирма Vector Labs. Их можно приготовить и самостоятельно с использованием опубликованных ранее методик (Hsu et al., 1981a, b). Обычно используют авидин и биотин — пероксидазу в концентрации около 10 мкг/мл и 2,5 мкг/мл соответственно. Следует отметить, что для получения комплекса, содержащего доступные свободные центры связывания биотина, необходимо инкубировать конъюгат [биотин — пероксидаза] с некоторым избытком авидина. В то же время заметный избыток свободного авидина может снижать чувствительность определения из-за конкуренции между свободным авидином и АБК за связывание с биотинилированными антителами. При избытке биотин — пероксидазы происходит насыщение центров связывания в молекулах авидина, в результате чего образуются комплексы, практически неспособные связывать дополнительные количества биотина и непригодные для использования в АБК-методе.

Приведем один из примеров, иллюстрирующих влияние соотношения авидина и биотин — пероксидазы на интенсивность

Таблица 26-1.

Концентрация биотинил — пероксидазы, мкг/мл	Концентрация авидина, мкг/мл					
	40	20	10	5	2,5	1,25
1,25	—	—	2+	2+	1+	—
2,5	1+	2+	3+	1+	1+	—
5	2+	3+	3+	1+	—	—
10	3+	2+	1+	—	—	—
20	3+	1+	—	—	—	—

последующего окрашивания при иммунологическом определении IgG в тканевых срезах щитовидной железы (при тиреоидите Хасимото) с использованием в качестве хромогенного субстрата смеси H_2O_2 — диаминобензидин. Для полуколичественной оценки интенсивности окрашивания использовали следующие обозначения: «3+» — черно-коричневое окрашивание; «2+» — коричневое; «1+» — желто-коричневое окрашивание и «—» — отсутствие окрашивания (табл. 26-1).

Для иммуногистохимических анализов мы обычно использовали соотношение авидин/биотинил — пероксидаза 10/2,5, которому соответствует максимальная чувствительность при минимальном фоновом окрашивании. Коммерческий препарат, поставляемый Vector Labs, содержит два реагента, А и Б, которые следует растворять по отдельности. Препарат АБК оптимального состава и концентрации получали при смешивании равных объемов (по 10 мкл) раствора А (авидина) и раствора Б (биотин — пероксидазы) с 1 мл буфера.

Анализ тканевых срезов с помощью иммунопероксидазного АБК-метода

Ниже приведена методика обнаружения IgG в тканевых срезах:

1. При использовании парафинированных срезов удаление парафина и регидратацию проводят обычным способом. Замороженные срезы на 5 мин погружают в холодный ацетон или другой мягкий фиксирующий раствор, например метанол или этанол.
2. Промывают срезы 5 мин в ТСБ (или ФСБ).
3. Инкубируют в 1%-ной нормальной кроличьей сыворотке, разведенной ТСБ. Лучше использовать на этом этапе сыворотку животных того же вида, что и при получении вторых антител.
4. Инкубируют 30 мин с препаратом кроличьих антител против IgG в подходящем разведении (обычно 1 : 400

для парафинированных срезов и 1 : 2000 или 1 : 3000 для замороженных срезов).
5. Промывают в ТСБ в течение 5 мин.
6. Инкубируют с биотинилированными антителами козы против иммуноглобулинов кролика в разведении 1 : 200 в течение 30 мин.
7. Промывают 5 мин в ТСБ.
8. Инкубируют с препаратом АБК в течение 30 мин.
9. Промывают 5 мин в ТСБ.
10. Проявляют в растворе субстрата, например в смеси H_2O_2 — диаминобензидин. Раствор субстрата готовят следующим образом: 100 мг диаминобензидингидрохлорида (Sigma) растворяют при перемешивании в 200 мл ТСБ и фильтруют; добавляют 1 мл 8%-ного водного раствора хлорида никеля и 25 мкл 30%-ного H_2O_2.
11. Останавливают реакцию промыванием срезов в ТСБ.

В тех случаях, когда имеются биотинилированные первые антитела, приведенная методика может быть сокращена за счет стадии взаимодействия со вторыми антителами. В подобной системе можно тестировать любые вещества, меченные биотином. Так, можно использовать биотинилированные лектины, которые выявляют визуально с помощью АБК и взаимодействия с субстратом (Hsu et al., 1982a, c, d, e).

Преимущества авидин-биотиновых систем анализа

Небольшие биотиновые молекулы могут быть конъюгированы с белком или с каким-либо другим веществом в относительно мягких условиях. Поэтому биотинилирование протекает, как правило, с сохранением биологического или физиологического сродства конъюгированного компонента. Размер этого компонента после конъюгации изменяется лишь в небольшой степени. В тех случаях (например, при иммуноэлектронной микроскопии), когда молекулярный размер антител существенно сказывается на эффективности проникновения в ткани, биотинилированные Fab′-фрагменты иммуноглобулинов являются оптимальными реагентами (Childs, Unabia, 1980, 1982).

Вещества, меченные биотином, могут быть обнаружены с помощью любого из используемых конъюгатов или комплексов авидина с тем или иным индикаторным реагентом типа авидин — флуоресцеин, авидин — ферритин или АБК. Таким образом, после того как вещество помечено биотином, для его обнаружения можно приспособить любую систему анализа. В то же время при использовании антител, меченных флуоресцеином или пероксидазой, круг их применения ограничен, т. е. авидин-биотиновая система характеризуется гораздо большей гибкостью, чем дру-

гие системы анализа, основанные на использовании ферментных конъюгатов.

Меченные биотином иммуноглобулины и лектины весьма стабильны. Их реакционная способность остается неизменной при хранении в течение 3 лет при 4 °С. То же верно и для авидина, и для конъюгата [биотин — пероксидаза]. Мы обычно готовим АБК непосредственно перед использованием для анализа тканевых срезов. Комплекс можно сохранять при 4 °С не менее двух дней. Впрочем, систематического изучения стабильности комплекса мы не проводили.

Применение АБК в системах анализа, отличных от иммуногистохимической

Для каждой системы регистрации наиболее существенным фактором является выбор подходящего субстрата. При анализе тканевых срезов, дегидратируемых спиртом и ксилолом, необходимо выбирать субстрат таким образом, чтобы конечный продукт его превращения был нерастворим в спирте и ксилоле. С этой точки зрения диаминобензидин, который, правда, считается потенциальным канцерогеном, является оптимальным субстратом. В других тест-системах конечный продукт реакции должен быть растворимым и придавать раствору определенную окраску для последующего измерения на спектрофотометре. С этой точки зрения хорошим субстратом является *о*-фенилендиамин (реакционная смесь содержит 20 мг субстрата в 50 мл фосфатного буфера, содержащего 0,03% H_2O_2).

В литературе подробно описано использование АБК-метода в ИФА (Madri, Barwick, 1983), иммуноэлектронной микроскопии (Childs, Unabia, 1982), гибридизации нуклеиновых кислот (Myerson et al., 1984) и иммунологическом скрининге кДНК-содержащих клонов (Hsu et al., 1985).

Фоновое и неспецифическое окрашивание

Биотин является коферментом декарбоксилазы и присутствует во многих тканях, таких, как ткани печени, поджелудочной железы, почек, кишечника. В фиксированных тканевых препаратах биотинсодержащие белки, судя по всему, разрушаются при фиксации формалином или в ходе обработки парафином. При анализе таких препаратов не происходит непосредственного связывания АБК с тканями или клетками. В случае замороженных срезов таких тканей, как ткани печени, почек, поджелудочной железы и т. п., следует проводить предварительную обработку срезов авидином (25 мкг/мл) в течение 15 мин и после промывания в буфере еще 15-минутную обработку биотином в насыщающей концентрации. При предварительной обработке

авидином блокируются эндогенные молекулы биотина. Поскольку авидин имеет тетрамерную структуру с четырьмя центрами связывания биотина, для предотвращения взаимодействия с АБК или биотинилированными антителами необходима дополнительная обработка биотином, позволяющая блокировать все свободные центры связывания. Связанный с авидином биотин не способен взаимодействовать со второй молекулой авидина (Hsu, Raine, 1982b).

АБК взаимодействует с тучными клетками в составе как фиксированных, так и замороженных тканевых срезов. Это взаимодействие не удается подавить предварительной авидин-биотиновой обработкой. Можно использовать раствор АБК в буфере с повышенным значением pH (8,5) или с высокой ионной силой (0,5 M NaCl). Высокие значения pH или ионной силы не сказываются на процессе взаимодействия АБК с биотином, но они могут подавлять или сводить к минимуму нежелательное связывание АБК с тучными клетками.

В тест-системах типа ELISA или с применением блотов фоновое связывание АБК можно свести к минимуму, проводя предварительную обработку пластиковых плат или листов нитроцеллюлозы 0,01%-ным тритоном X-100.

Биотинилирование белков

Для биотинилирования иммуноглобулинов, лектинов или других гликопротеинов можно использовать следующую методику.

1. Растворяют N-гидроксисукцинимидное производное биотина (Sigma) в диметилсульфоксиде до концентрации 1 мг/мл.
2. Готовят раствор иммуноглобулинов или других гликопротеинов: 1 мг/мл в 0,1 M $NaHCO_3$, pH 9,0.
3. Смешивают два раствора в объемном соотношении 1:8 (активированный биотин : белок) и инкубируют при комнатной температуре в течение 4 ч.
4. Диализуют против фосфатного буфера.
5. Концентрируют раствор при помощи вакуум-диализа.

Методика биотинилирования нуклеиновых кислот подробно описана в работе Leary et al., 1983.

Заключение

Благодаря очень высокому сродству между авидином и биотином при использовании метода, основанного на образовании авидин-биотинового комплекса, достигается чрезвычайно высокая чувствительность определения. Одним из важнейших пре-

имуществ метода является его универсальность, которая позволяет приспособить его к работе с практически любой тест-системой. В настоящем обзоре мы совершенно не останавливались на количественных аспектах метода, которые в действительности и с технической точки зрения, и в принципиальном отношении мало чем отличаются от особенностей количественного анализа на основе взаимодействия антиген — антитело, весьма подробно рассмотренных в этой книге.

Литература

Azen E. A., Yu P. L. (1984). Genetics polymorphism of CON 1 and CON 2 salivary proteins detected by immunologic and Concanavalin A reactions on nitrocellulose with linkage of CON 1 and CON 2 genes to the SPC (salivary protein gene complex), Biochem. Genetics, **22**, 19.

Bayer E. A., Wilcheck M. (1980). The use of the avidin-biotin complex as a tool in molecular biology, Methods Biochem. Anal., **26**, **1**.

Childs G., Unabia G. (1980). The application of the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method to the light microscopic localization of pituitary hormones, J. Histochem. Cytochem., **30**, 713.

Childs G., Unabia G. (1982). Application of a rapid avidin-biotin peroxidase complex (ABC) technique to the localization of pituitary hormones at the electron microscopic level, J. Histochem. Cytochem., **30**, 1320.

Guesdon J. L., Ternynck T., Avrameas S. (1979). The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymacic techniques, J. Hystochem. Cytochem., **27**, **1131**.

Hofmann K., Kiso Y. (1976). An approach to the targeted attachment of peptides and proteins to solid supports, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 3516.

Hofmann K., Finn F. M., Friesen H. J., Diaconescu C., Zahn H. (1977). Biotinyl insulins as potential tools for receptor studies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 2697.

Holland P. C., Pena S. D. J., Guerin C. W. (1984). Developmental regulation of neuramidase-sensitive lectin binding glycoproteins during myogenesis of rat LG myoblasts, Biochem. J., **218**, 465.

Hsu P. L., Hsu S. M., Appela E., 1985. Immunological screening of a cDNA library using avidin-biotin-peroxidase complex method, Gene Anal. Tech. (in press).

Hsu S. M., Raine L., Fanger H. (1981a). A comparative study of the peroxidase-anty-peroxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies, Am. J. Clin. Pathol., **75**, 734.

Hsu S. M., Raine L., Fanger H. (1981b). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures, J. Histochem. Cytochem., **29**, 577.

Hsu S. M., Raine L. (1981c). Protein A, avidin and biotin in immunohistochemistry, J. Histochem. Cytochem., **29**, 1349.

Hsu S. M., Raine L. (1982a). Discovery of High Affinity of Phaseolus vulgaris agglutinin (PHA) with gastrin-secreting cells, Am. J., Clin. Pathol., **77**, 396.

Hsu S. M., Raine L. (1982b). Unwandet binding associated with avidin-biotin-peroxidase complex in frozen tissues, Am. J. Clin. Pathol., **77**, 775.

Hsu S. M., Raine L. (1982c). Versatility of biotin-labeled lectins and avidin-biotin-peroxidase complex for localization of carbohydrates in tissue sections, J. Histochem. Cytochem., **30**, 157.

Hsu S. M., Raine L. (1982d). Warthin's tumor-epithelial cell differences, Am. J. Clin. Pathol., **77**, 78.

Hsu S. M., Raine L. (1982e). Concanavalin A (Con A) reaction with plasma membrane, Am. J. Clin. Pathol., **77**, 508.

Hsu S. M., Soban E. (1982). Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its applications for duoble immunohistochemistry, J. Histochem. Cytochem., **30**, **1079**.

Hsu S. M., Ree H. (1983). Histochemical studies on lectin binding in reactive lymphoid tissues, J. Histochem. Cytochem., **31**, 538.

Hsu S. M., Raine L., 1983. The use of avidin-biotin-peroxidase-complex (ABC) in diagnostic and research pathology. In: Advances in Immunohistochemistry, Ed. R. A. DeLellis, Masson Publishing USA, Inc., New York, pp. 31—42.

Leary J. J., Brigati D. J., Ward D. C. (1983). Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 4045.

Leipold B., Remy W. (1984). Use of avidin-biotin-peroxidase complex for measurement of UV lesions in human DNA by micro-ELISA, J. Immunol. Methods, **66**, 227.

Madri J. A., Barwick K. W. (1983). Use of avidin-biotin-complex in ELISA system. A quantitative comparison with two other immunoperoxidase detection systems using keratin antisera, Lab. Invest., **48**, 98.

Myerson D., Hackman R. C., Meyers J. D. (1984). Diagnosis of cytomegaloviral pneumonia by in situ hybridization, J. Infect. Diseases, **150**, 272.

Rosencoetter M., Reder A. T., Oger J. J. F., Antel J. P. (1984). T cell regulation of polyclonally induced immunoglobulin secretion in humans, J. Immunol., **132**, 1779.

Список авторов

Bers, George E. Bio-Rad Laboratories, Research Product Group, 32nd & Griffin Ave., Richmond, CA 94804.
Butler J. E. Department of Microbiology, The University of Iowa Medical School, Iowa City, IA 52242.
Castro, Albert. Department of Pathology, University of Miami School of Medicine, Miami, FL 33101.
Freytag, William J. E. I. du Pont de Nemours & Co., Inc., Biomedical Products Department, Glasgow Research Laboratory, Wilmington, DE 19898.
Geoghegan, William D. Department of Dermatology, The University of Texas Health Science Center-Houston, 6431 Fannin, MSMB 1—204, Houston, TX 77030.
Gibbons, Ian. Syva Research Institute, 900 Arastradero Road, Palo Alto, CA 94304.
Giegel, Joseph L. American Dade Company, American Hospital Supply Corp., 1851 Delaware Parkway, Miami, FL 33152.
Halbert, Seymour P. Cordis Laboratories, 2140 North Miami Avenue, Miami, FL 33127.
Hancock, Kathy. Division of Parasitic Diseases, Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control, Public Health Service U. S. Department of Health and Services, Atlanta, GA 30333.
Hsu, Su-Ming. Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Texas Health Science Center, Houston, TX 77030.
Jaklitsch, Anna. Syva Company, 900 Arastradero Road, Palo Alto, CA 94304.
Kabakoff, David S. Hybritech Inc., 11095 Torreyana Road, San Diego, CA 92121.
Kelly, Tim A. Bartels Immunodiagnostic Supplies, Inc., P. O. Box 3093, Bellevue, WA 98009.
Koertge, T. E. Department of Periodontics, Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA 23298.
Lenhoff H. M. Department of Developmental and Cell Biology, University of California, Irvine, CA 92717.
Lin, Tsue-Ming. Cordis Laboratories, 2140 North Miami Avenue, Miami, FL 33127.
Litchfield, William J. Diagnostic & Bioresearch Systems Division, E. I. Du Pont de Nemours & Co., Inc., Glasgow Research Laboratory, Wilmington, DE 19898.
Litman, David J. Syntex Medical Diagnostics Division, 3221 Porter Drive, Palo Alto, CA 94304.
Milby, Kristin H. Monsanto Company, 800 Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167.
Monji, Nobuo. Genetic Systems Corporation, 3005 First Avenue, Seattle, WA 98121.
Ngo T. T. Department of Developmental and Cell Biology, University of California, Irvine, CA 92717.
Peterman J. H. Department of Microbiology, The University of Iowa Medical School, Iowa City, IA 52242.
de Savigny, D. Ontario Ministry of Health, Box 9000, Toronto, Canada.
Sevier, E. Dale. Hybritech Inc., 11095 Torreyana Road, San Diego, CA 92121.
Shimizu, Stanley. Hybritech Inc., 11095 Torreyana Road, San Diego, CA 92121.
Speiser, F. Swiss Tropical Institute, Socinstrasse 57, 4051 Basel, Switzerland.
Standefer, Jim C. Department of Pathology, University of New Mexico School of Medicine, Albuquerque, NM 87131.
Tsang, Victor C. W. Division of Parasitic Disease, Center for Infectious Diseases, Center for Disease Control, Public Health Service, U. S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA 30333.
Usategui-Gomez, Magdalena. Hoffman-LaRoche, Inc., Department of Diagnostic Research, 340 Kingsland Street, Nutley, NJ 07110.
Wicks, Richard. Hoffman-LaRoche, Inc., Department of Diagnostic Research, 340 Kingsland Street, Nutley, NJ 07110.
Wong, R. C. Department of Developmental and Cell Biology, University of California, Irvine, CA 92717.

Список сокращений и обозначений

АГ — аффинный гель
Аг — антиген

АНСК — 8-амино-1-нафталинсульфоновая кислота
АпоГО — апоглюкозооксидаза
Ат — антитела
БСА — бычий сывороточный альбумин
БСБ — боратно-солевой буфер
ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография
ГА-агароза — галактозиламин-агароза
β-Гал — β-галактозидаза
ГДХБС — 2-гидрокси-3,5-дихлорбензосульфонат
β-ГКГА — 6-(7-β-галактозилкумарин-3-карбоксамидо) гексиламин
ГО — глюкозооксидаза
ГолоГО — гологлюкозооксидаза
ГСМБ — N-гидроксисукцинимид-*м*-малеимидобензоат
Г6ФДГ — глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназа
ГФК — *п*-гидроксифенилуксусная кислота
ДАБ — 3,3′-диаминобензидин
ДГФР — дигидрофолатредуктаза
ДМА — N,N-диметиланилин
ДМАБК — 3-(диметиламино) бензойная кислота
ДСА — *п*-(дигоксигенин-3-0-сукцинамид) анилин
ДСА-МБ — *м*-малеимидобензоильное производное *п*-(дигоксигенин-3-0-сукцинамид) анилина
ДСН — додецилсульфат натрия
дцДНК — двухцепочечная ДНК
ДФГ — дифенилгидантоин
ДХФ — дихлорфлуоресцеин
ДЭА — N,N-диэтиланилин
ИЛ — иммобилизованный лиганд
ИР — иммобилизованный рецептор
ИФА — иммуноферментный анализ (англ. EMI)
ИФАИМ — иммуноферментный анализ, основанный на ферментативной иммунометрии (англ. IEMA)
ИФАКО — иммуноферментный анализ, основанный на конформационных ограничениях (англ. AICREIA)
ИФАМ — иммуноферментный анализ с помощью модуляторов ферментов (англ. EMMIA)

ИФАПГ	иммуноферментный анализ с применением в качестве метки простетических групп (англ. PGLEIA)
ИФАПЗ	иммуноферментный анализ, основанный на пространственных затруднениях (англ. SHEIA)
ИФАФС	иммуноферментный анализ с применением в качестве метки флуорогенных субстратов (англ. FSIA)
ИФАЯМ	иммуноферментный анализ с применением в качестве дополнительного маркера якорной молекулы (англ. AMETIA)
ИФК	иммуноферментный комплекс
К	кортизол
КГС	кортизолгемисукцинат
КГС-МБ	*м*-малеимидобензоильное производное **кортизол-21-гемисукцината**
КДИ	карбодиимид
КК	креатинкиназа
β-ККГ	β-[7-(3-карбоксикумаринокси)]-D-галактозид
К-МБ	кортизол-21-*м*-малеимидобензоат
КФП	кислая фосфатаза простаты
Л	лиганд
ЛДАДХФ	лейкодиацетилдихлорфлуоресцеин
ЛДГ	лактатдегидрогеназа
М	маркер или модулятор
МБК	*мета*-малеимидобензойная кислота
МБТГ	3-метил-2-бензотиазолинонгидразон
МБХ	*мета*-малеимидобензоилхлорид
МДГ	малатдегидрогеназа
МЕ	международные единицы активности
мМЕ	международные миллиединицы активности
МТ	метотрексат
4-МУГ	4-метилумбеллиферил-β-D-галактозид
4-МУФ	4-метилумбеллиферилфосфат
МЭМБТ	метиловый эфир *м*-малеимидобензоил-L-тироксина
Н	носитель
НР	нерастворимый рецептор
опт. ед.	оптические единицы
П	продукт
ПААГ	полиакриламидный гель
ПХ	пероксидаза хрена
РИА	радиоиммунологический анализ
РФ	ревматоидный фактор
С	субстрат
СГН	стрептококковый гломерулярный нефрит
СКВ	системная красная волчанка
Т или T_4	гироксин
ТГФ	тетрагидрофуран
Тео	теофиллин

ТСХ	тонкослойная хроматография
усл. ед.	условные единицы
Ф	фермент
ФЗМ	фермент-зависимая метка
ФСБ	фосфатно-солевой буфер
ФСБ-Т	фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,05% твина-20
ФХ	фосфатидилхолин
ХГТЧ	хорионический гонадотропин человека
ХМТ	хорионический маммотропин
ЦФБ	цитратно-фосфатный буфер
ЧСА	человеческий сывороточный альбумин
Я	якорь, или якорная молекула
ELISA	ферментативный иммуносорбционный анализ (от англ. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
EMIT-анализ	гомогенные методы иммуноферментного анализа (от англ. Enzyme Myltiplied Immunoassay Technique)
FAD	флавинадениндинуклеотид
HEPES	N-2-гидроксиэтилпиперазин-N′-2-этансульфоновая кислота (от англ. N-2-hydroxyethylpiperazine-N′-2-ethanesulfonic acid)
NP-40	нонидет P-40
S	стандартное отклонение
S_m	стандартное отклонение среднего арифметического (стандартная ошибка)
r	коэффициент корреляции
V	коэффициент вариации

Предметный указатель

Авидин 32, 63—64, 66, 168, 277, 413
— иммобилизация на аминогексил-сефарозе 277
— меченый, комплекс с биотином (МАБ-метод) 415—416
Авидин-биотиновая система 413, 414
— — методы анализа 414—415
— — применение 413—414
Авидин-биотиновые методы иммуноферментного анализа 415—419
Авидин-биотиновый комплекс (АБК) 415, 417, 420, 421
— — биотинилирование белков 421
— — иммунопероксидазный метод (АБК-метод) 415, 417—419
— — основы АБК-метода 417—418
— — преимущества его использования 419—420
— — фоновое и неспецифическое связывание 420—421
— мостик (АБМ-метод) 415, 416
Аденозинмонофосфат (AMP) как ингибитор 74
Аденозинтрифосфат (ATP) 74, 169
Аллостерическое ингибирование 13
Альбумин, защита фермента от антифермента 111—112
Аминогликозиды 43—51
Амплифицированный фермент-зависимый иммуносорбционный анализ (ELISA) 210—242. *См. также* Метод ELISA
Анализ EMIT 36—53, 103—120
— — влияние ионного состава среды 113
— — декстрансульфат 46—47
— — иммуноанализ на основе «ферментных каналов» 114—120
— — колориметрический иммуноанализ на основе ингибирования фермента 103—106
— — контроль лекарственных препаратов 42—43
— — методика 43
— — обработка данных 52—53
— — определение аминогликозидов 44—52
— — — гаптенов 36—53
— — — макромолекул 103—120
— — — С-реактивного белка 105—106, 109—110
— — — ферритина 110—113
— — принцип 38—39
— — стабильность реагентов 51—52
— — токсикологический анализ мочи 37, 39—40
— — — — сыворотки 41—42
— — турбидиметрический иммуноанализ на основе активации фермента 106—110
— — флуориметрический иммуноанализ на основе ингибирования фермента 110—113
Антиген, анализ распределения 239—241
— иммобилизация на носителе 195, 220—221, 228
— — совместно с ферментом 20, 115
— кинетика связывания 138, 139, 144, 145—147
— непрямой конкурентный анализ 241
— обнаружение 368, 379, 381—383
— получение 348—351, 369
— центры связывания антител (эпитопы) 26, 244, 245
Антиглобулины изотип-специфические 211, 212, 213, 216, 217—220, 224, 238
— — антиглобулиновое ингибирование 238
— — аффинная хроматография 212
— — получение 212—213
— — проверка специфичности 217—219
— мостиковые 211, 212, 216, 219
Антитела, адсорбция на носителе 177—179, 184
— высвобождение из связанного состояния 185
— иммуноферментный анализ 193—208
— количественное определение 368
— концентрация и эффективность связывания с носителем 184
— конъюгация с ферментом 134, 174—176, 179—180, 185—187, 247
— моноклональные 49, 367, 385—389, 392—399
— — бифункциональные 396—397
— — вариант иммуноанализа «4i» 398
— — влияние pH среды на связывание антигена 395—396
— — диагностика рака 397—398
— — «кооперативное» связывание антигена 398
— — преимущества по сравнению с поликлональными антителами 385—386, 387—388, 389, 392, 395
— — трудности в обнаружении антигенов 353—354
— — химическая гомогенность 389, 390
— мостиковые 211, 212, 216—219
— — «короткие замыкания» 216, 217
— — первичные антитела 216, 217, 219
— очистка 176—177, 185
— поликлональные, сравнение с моноклональными 49, 385—386, 388—389, 392—393, 395
— получение мономерных конъюгатов (Fab′ — β-галактозидаза) и (Fab′ — пероксидаза) 247
— пространственная «напряженность» 184
— сукцинилированные 106—109
Апоглюкозооксидаза 15—16, 69, 70, 72, 73, 75, 97—98, 99
— получение 70
Апопероксидаза 17
Апофермент 15, 16, 18, 19, 69, 70, 75, 97, 98
— ковалентно связанный с лигандом 18—19
— ограничение конформационной подвижности 97
Аффинные сорбенты 29—30, 188, 213, 250, 251, 252
— — 6-аминокапроил-β-D-галактозиламин агарозы 30, 259, 260, 261
— — иммобилизация антигена 251
Ацетилхолинэстераза 65
— ацетил-β-(метилтио)холиниодид как субстрат 65
— β-(метилтио)холин — продукт гидролиза 65
Бензодиазепин 37, 39, 40
Биотин 32, 66, 413—422
— конъюгаты с антителами 32
— — — ферментами 32

Внутренний стандарт 135—136, 137, 144

β-Галактозидаза 14, 18, 30, 31, 103—104, 106—112, 247—248, 251, 264, 265, 267, 269, 271, 304
— использование при флуориметрическом ИФА 286—287, 290, 292
— конъюгация с биотином 277
— — — — и ДНФ-лизином 277—278
— — — малеимидным производным дигоксина 269, 272—273
— — — — — кортизола 267, 271—272
— — — — — тироксина 265—266, 270—271
— — — Fab′- и F(ab)$_2$-фрагментами 247
— преимущества как реагента 248
— субстрат *о*-нитрофенил-β-D-галактопиранозид 248
— эффективность катализа 248
Гаптены 36, 37, 43, 50, 77, 81
Гексокиназа 21, 169
Гельминты 370, 373—374, 377—378
— антигены 370, 372, 373—374, 377—378
— использование метода ELISA для обнаружения антител 369—370, 371, 372, 373, 374, 375, 376—378
Гетеробифункциональные реагенты 174, 247, 248
Гетерогенный анализ *см.* Иммуноферментный анализ с разделением компонентов
Глюкозооксидаза 15, 24, 97, 98—100, 117—118, 131, 132, 133
— восстановление активности 99
— меченная 2,4-динитрофенильными группами 98
— определение активности 98
Глюкозо-6-фосфат — дегидрогеназа (Г6ФДГ) 21, 36, 37, 39, 43, 46, 115—116
— ингибирование декстрансульфатом 46—47
— «ферментные каналы» 21, 115—116
Гологлюкозооксидаза 15—16, 72, 73, 74, 75, 76
— восстановление активности 72, 73
Голофермент 15—16, 74, 97
Гомобифункциональные реагенты 174, 247

Гомогенный анализ *см.* Иммуноферментный анализ без разделения компонентов

Дигоксин 22, 123, 247, 298
— получение производных 268—269
3-(Диметиламино)бензойная кислота (ДМАБК) 400, 403, 405, 409
2,4-Динитрофенильная группа (ДНФ) 19, 97, 169, 247, 278—281
— — антитела к ней 280
Дихлорфлуоресцеин (ДХФ) 163, 165, 170
ДНК рекомбинантные 67

ИААК 245—255
— матрицы, используемые для колонок 250—251
— получение аффинных сорбентов 251, 252—253
— скорость потока через колонку 251—252
— условия проведения эксперимента 246, 247—250
— форма колонок 251
Изоферменты 30—31, 317—338
— аномальные 330—334
— креатинкиназа 30, 31, 317, 326—327, 330—334, 335—337
— лактатдегидрогеназа 30, 31, 317—318, 321, 322, 325, 335, 338
Иммобилизация 133, 145—146, 250—251
— метод периодатного окисления/боргидридного восстановления 251
Иммунные комплексы 182—183
— — ложные положительные ответы 183
Иммуноглобулин G (IgG) 16, 18, 87, 89, 90, 91, 92, 163—164, 166—167, 169, 216, 218
Иммунокапиллярная миграция 24, 150—151
Иммунометрический анализ с применением аффинных колонок (ИААК) 245—255. *См. также* ИААК
Иммунопероксидазные методы (ИПМ) 413—422. *См. также* ИПМ
Иммуноферментный анализ антител 26, 193—209. *См. также* Метод ELISA и сэндвич-анализ
— — без разделения компонентов 9, 12, 13—24, 36—171. *См. также* анализ EMIT, ИФАИП, ИФАКО, ИФАМ, ИФАПГ, ИФАФК, ИФАФС
— — — — — определение макромолекул 14, 18, 77, 81, 82—83, 87, 89, 92, 101—120. *См. также* ИФАФС и макромолекулярные субстраты
— — гаптенов и антигенов 172—189. *См. также* Метод ELISA
— — изоферментов 30—31, 317—338
— — основанный на конформационных ограничениях (ИФАКО) 18—19, 97—102. *См. также* ИФАКО
— — — — — пространственных затруднениях (ИФАПЗ) 29—30, 257—263. *См. также* ИФАПЗ
— — — — ферментативной иммунометрии (ИФАИМ) 26—27, 244—255, 300, 311—315, 385—399. *См. также* ИФАИМ
— — с помощью липосом без использования комплемента 21—22, 123, 126, 127
— — — — — — с использованием комплемента 22—23, 122—123, 124—126
— — — — модуляторов ферментов (ИФАМ) 14—15, 57—67. *См. также* ИФАМ
— — — применением в качестве метки ферментов 13—14, 36—54, 103—120. *См. также* Анализ EMIT
— — — — β-галактозидазы и высокомолекулярного субстрата 103—114. *См. также* Анализ EMIT
— — — — — индикаторных полосок (ИФАИП) 23—24, 130—160. *См. также* ИФАИП
— — — — простетических групп (ИФАПГ) 15—17, 69—76. *См. также* ИФАПГ
— — — — «ферментных каналов» (ИФАФК) 20, 24, 114—120, 130, 131—132, 136, 169. *См. также* ИФАФК
— — — — флуорогенных субстратов (ИФАФС) 17—18, 77—95. *См. также* ИФАФС
— — — — якорной молекулы (ИФАЯМ) 28—29, 275—283. *См. также* ИФАЯМ
— — — разделением компонентов 8, 12—13, 24—32, 131, 172—422. *См. также* ИААК, ИФАИМ, ИФАПЗ, ИФАЯМ, Метод a-ELISA, Метод ELISA, PP-ИФА
— — — — — ингибиторный 25
— — — — — конкурентный вариант ELISA 25, 172—173, 182
— — — — — непрямой конкурентный метод 27—28, 210, 211, 241
— — — — — последовательный (неконкурентный) вариант ELISA 172, 182
— — — — — сэндвич-анализ 26, 193, 194, 244, 245, 299—300, 307, 311—315, 316, 393
— — флуориметрические методы 285—296
— комплекс растворимый (ИФК) 213—216
— — — антитела к щелочной фосфатазе 213, 215
— — — получение 213—216
— — — характеристика 215
— — — хранение 215—216
— — — щелочная фосфатаза 213, 214, 215
Ингибиторы 15, 61—65, 66—67
— макромолекулярные 62—64
— — авидин 63—64, 66
— низкомолекулярные необратимые 64—65, 67
— — обратимые 64, 66—67
— — — метотрексат 64, 66—67
Индикаторные полоски 74, 130—160. *См. также* ИФАИП
— — матрицы 132
ИПМ (иммунопероксидазные методы) 413—422
— авидин-биотиновая система 414—420
— — — биотинилирование белков 421
— — — преимущества 419—420
— — — фоновое и неспецифическое окрашивание 420—421
ИФАИМ (ферментативная иммунометрия) 26—27, 244—255, 300, 311—315, 385—399
— двухцентровый вариант (сэндвич-анализ) 26, 244, 245, 300, 307, 311—315, 316, 392—394
— использование аффинных колонок (ИААК) 245—255
— моноклональные антитела 385—399
— — — бифункциональные 396—397, 398
— — — вариант «4i» 398
— — — визуальное определение антигена 394—396
— — — двухцентровый вариант 392—394
— — — измерения при двух длинах волн 392
— — — линейная калибровочная кривая 390—391
— — — перекрестные реакции 385, 386
— одноцентровый вариант 244
ИФАИП (ИФА с применением индикаторных полосок) 23—24, 130—160
— воспроизводимость и достоверность 142—144
— гетерогенные и гомогенные методы 131, 158
— кинетика связывания антигена 138—139
— на основе «ферментных каналов» 131—132, 150
— определение морфия 134, 139—140
— по типу двухцентрового сэндвич-метода 144—145
— с внутренним стандартом 135—144
— ультразвук 144—149
— ферментативная иммунохроматография 135, 149—159
— — — анализ цельной крови 155—158
— — — капиллярная миграция 150, 151
— хориогонадотропин человека (ХГТЧ) 144—148
ИФАКО (ИФА на основе конформационных ограничений) 97—102
— калибровочная кривая 100
— принцип метода 97, 101—102
ИФАМ (ИФА с помощью модуляторов ферментов) 57—67
— на основе макромолекулярных ингибиторов 62—64, 66
— — — низкомолекулярного необратимого ингибитора 64—65, 67
— — — — обратимого ингибитора 64, 66—67
— — — S-белка и S-пептида рибонуклеазы 15, 65, 67
— принцип 58—59
— разработка методики 59—60
ИФАПГ (ИФА с применением простетических групп) 67—76
— вещества, мешающие определению 74—75
— ингибирующее влияние антител 72—74
— индикаторные полоски 74, 76
— методика 70—72
— принцип 69—70
— точность и достоверность 74
ИФАПЗ (ИФА на основе пространственных затруднений) 29—30, 257—263
— агароза, модифицированная галактозамином 30, 259, 262
— аффинная хроматография 259, 260, 261, 262
— конъюгат [ХМТ — β-галактозидаза] 258, 259

— система для тироксина 260, 262
— — — хориомаммотропина (ХМТ) 258—259, 260—262
ИФАФК (ИФА на основе «ферментных каналов») 114—120
— гексокиназа в качестве метки 115, 116
— использование растворимых реагентов 118—120
— пероксидаза в качестве метки 118—120
— полирибозофосфат 118, 119
— эффективность работы «канала» 117
ИФАФС (ИФА с применением флуорогенных субстратов) 77—95
— достоверность результатов 89, 91, 92, 94
— индикаторные полоски для твердофазного анализа 93—94
— конкуренция за связывание 86—87, 93
— недостатки 94—95
— принцип метода 77—78
— стандартные методики 81—83
— титрование антител 86
— точность метода 87—89, 93, 94
ИФАЭП (электроперенос с ИФА) 341—362
— блокирование центров связывания антител 359—360
— ДСН-электрофорез в ПААГ 342, 343
— матрицы для блота 355
— методика 343—346
— моноклональные антитела 353—354
— нитроцеллюлоза 343, 344, 345, 355
— один препарат антигена/различные препараты антител 348, 350, 351
— пределы чувствительности метода 351
— различные препараты антигена/один препарат антител 348, 349
— растворы 343
— ферментные конъюгаты 361—362
ИФАЯМ (ИФА с применением в качестве маркера якорной молекулы) 28—29, 275—283
— конкуренция за связывание с рецептором 281
— методика 277—281
— ограничения 283
— отличительные особенности 281—282
— принцип метода 28—29, 275—276, 283
Каталаза 117—118, 119
Катионный тетраазопентаметиновый краситель 401
Кинетика связывания антигена с конъюгатом [антитело — фермент] 250
Колориметрический анализ на основе ингибирования фермента 103—106, 113—114
Конкурентный гетерогенный анализ 172
Конъюгаты [модулятор — лиганд] 14—15, 16, 57, 58, 59—61, 64, 67
Конъюгация антител с ферментом 174—176, 180—183, 185—187
— — — — антигенные центры 187
— — — — внутримолекулярные сшивки 186
— — — — гетеробифункциональные реагенты 174
— — — — гомобифункциональные реагенты 174
— — — — использование глутарового альдегида 174, 186
— — — — кинетика превращения субстрата 180
— — — — концентрация конъюгата 179—180
— — — — «мостиковое связывание» 187
— — — — периодатное окисление 175—176
— — — — стабильность конъюгатов 176
— — — — титрование конъюгатов 371—372
Креатинкиназа 30, 31, 317, 326—334, 335—337, 393—394
— аномальные изоферменты 327—334
— изоферменты 327—334
— иммунохимический метод определения изофермента 327—334
— клинические испытания иммунохимического метода 334—337
Кровь, иммуноанализ 155—157, 159
— — агглютинация 155

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) 30, 31, 317—326, 338
— антисыворотки 319—321
— изоформы 30, 31, 317—318, 321, 322, 335, 338
— иммунохимический анализ ЛДГ-1 318—323
— инфаркт миокарда 317
— клинические исследования 323—326
— мономерные субъединицы 317—318

— очистка ЛДГ-5 318—319
Лейкодиацетилдихлорфлуоресцеин как субстрат пероксидазы 163
— активирование 164, 165, 166
Лизоцим 36
Липосомы 10, 21—23, 122—123, 124—128
— лизис с помощью системы комплемента 122, 123, 125, 126

Макромолекулярные субстраты 103, 104, 105, 107, 110, 113
— — поликатионные полимеры 107, 113
— — стерическое исключение 103—104
— — флуорогенные 110, 113, 114
— — хромогенные 104, 113
Малатдегидрогеназа (МДГ) 36, 39
Малеимид, его производные как бифункциональные реагенты 174, 248
м-Малеимидобензоильные производные гаптенов 264—273
— — — конъюгация с β-галактозидазой 265, 267, 269, 270, 271, 272, 273
— — — кортизол-21-*м*-малеимидобензоат (К-МБ) 266, 267, 271, 272
— — — *м*-малеимидобензоилхлорид (МБХ) 265
— — — *м*-малеимидобензойная кислота (МБК) 265
— — — метиловый эфир *м*-малеимидобензоил-L-тироксина (МЭМБТ) 265, 266, 270
— — — производное *п*-(дигоксигенин-3-о-сукцинамид)анилина (ДСА-МБ) 269
— — — — кортизол-21-гемисукцината (КГС-МБ) 266, 267, 271
— — — *п*-фенилендиамин как сшивающий агент 266, 269
Матричный эффект 187—188
— — загиб кривой связывания антигена 188
— — отрицательная кооперативность 188
— — ферритин 188
Мембрана липосом 21—22, 122, 123, 125
— — литическая активность конъюгата [лиганд — цитолизин] 21—22, 123, 124, 125, 126—127
3-метил-2-бензотиазолинонгидразон (МБТГ) 400—405, 407, 408, 409, 410, 411
Метки изотопные 8, 10
— неизотопные 10
Метод Нго — Ленхоффа 72, 400—411
— a-ELISA (амплифицированный фермент-зависимый иммуносорбционный анализ) 210—242
— — влияние аффинности и авидности антител на их определение 232—235
— — «короткие замыкания» в цепи последовательности реакций 216—217
— — непрямой конкурентный анализ 241
— — получение растворимого иммуноферментного комплекса 213—216
— — — специфических антиглобулинов 212—213
— — распределение антигена 210, 239—241
— — реакция иммуноферментного комплекса с субстратом 227—228
— — сопоставление с другими вариантами ELISA 211
— ELISA (ферментативный иммуносорбционный анализ) 172—189, 193—209, 369—383
— — адсорбция 204
— — антитела различных классов 201—203
— — аутоиммунные заболевания 193, 194, 207—208
— — блокирование 204, 205—206
— — быстрый мультиантигенный вариант 369—378
— — диагностическое значение 207—209
— — иммобилизация антигена на носителе 195
— — инфекционные заболевания 193, 194, 207—208
— — кинетический вариант (K-ELISA) 376
— — микроварианты 220—239
— — — адсорбция антигенов 220—221
— — — антигенная конкуренция 230—231
— — — аффинность и авидность антител 232—235
— — — влияние поливалентности антител 234—235
— — — концентрация антигена 220—221
— — — минорные антитела 223—224
— — — титрование первичных антител 222—224
— — обнаружение паразитарных антигенов 378—383
— — пороговый уровень сигналов 198

— — специфичность 204—206
— — степень очистки антигена 195
— — — — антител с ферментной меткой 195—196
— — сэндвич-методы 193, 194
— — тест-системы CORDIA 193, 194, 197, 199, 205, 207—208
— — фоновая активность 200—201
— — чувствительность 181—182, 185—186
Метотрексат 64, 66
— конъюгат с тироксином 64
Модуляторы ферментов 10, 14, 57, 58, 59, 67
— — отрицательные 15
— — положительные 15
— — связанные с лигандом 14, 58, 59—61

Непрямой конкурентный иммуноферментный анализ 241
Никотинамидадениндинуклеотид (NAD) 74, 169
— восстановленный (NADH) 169
— — флуоресцентные свойства 285
Носитель твердофазный для антигена 195
— — — антител 177—179,298

Паразиты, тропические заболевания 367—368, 377, 378, 381, 383
— — — иммуноферментный анализ антигенов 378—383
Пероксидаза 24, 60, 62, 63, 72, 117, 118—120, 131, 163, 166, 196, 400—411, 413, 414, 417
— антитела против нее 60, 63
— биотинилирование 417
— использование в авидин-биотиновых системах анализа 415, 417—418, 420
— — для флуориметрического ИФА 286, 287, 291
— канцерогенность субстрата *о*-фенилендиамингидрохлорида 196
— метод Нго — Ленхоффа 72, 400—411
— — — вещества, мешающие определению 408—409
— — — влияние pH и состава буфера на активность 410
— — — 3-(диметиламино)бензойная кислота (ДМАБК) 72, 400, 403, 405, 407—411
— — — индаминовый краситель 403, 405
— — — 3-метил-2-бензотиазолинонгидразон (МБТГ) 400—404
— — — механизм образования индаминового красителя 403
— — — развитие окраски 404, 405, 408, 410
— — — скорость развития окраски 405
Пируваткарбоксилаза 64
Простетические группы как метки 15—17, 24, 69—76
Псевдохолинэстераза 65

Радиально-распределительный иммуноферментный анализ (РР-ИФА) 298—316. *См. также* РР-ИФА
Радиоиммунологический анализ (РИА) 8, 10
Реактив Нго — Ленхоффа (МБТГ — ДМАБК) 404, 408, 411
С-реактивный белок 24, 105, 106, 109
Рибонуклеаза (РНКаза) 15, 65, 67
— S-белок 15, 65, 67
— S-пептид 15, 65, 67
РР-ИФА 298—316
— конкурентный анализ 298—299, 309—311
— общие принципы 298—300
— определение дигоксина 306—309
— — тироксина 309—311
— — ферритина 311—315
— последовательный анализ 298, 306—309, 316
— сэндвич-анализ 300, 311—315, 316
— устройство прибора 300—303
— «эффект загиба» 314—315

Сшивающие агенты 79, 247—248, 264
— — гетеробифункциональные 247, 248
— — гомобифункциональные 247
Сыворотка, терапевтический анализ 37
— токсикологический анализ 37, 41
Сывороточные белки, иммуноанализ 103—113
Сэндвич-анализ 26, 244—245, 299—300, 307, 311—315, 316, 393

Теофиллин 16, 64, 67, 124—125, 126, 156, 157
— конъюгация с фосфатидилэтаноламином 125
Тироксин 15, 30, 61, 64—67, 260, 262, 265—266, 270, 271
— метиловый эфир *м*-малеимидобензоил-L-тироксина (МЭМБТ) 265, 266, 270
Турбидиметрический иммуноанализ

на основе активации фермента 106—110, 113—114

Уабаин 22, 123, 124, 127
Ультразвуковой скоростной иммуноанализ 134, 144—149
— — — определение хориогонадотропина человека (ХГТЧ) 134, 147—148
— — — принцип и методика 144—145
— — — связывание ХГТЧ 145—147
Умбеллиферил-β-D-галактозид 14, 77, 78, 168
— синтез карбокси-производных 78—79
Усиление ферментативных сигналов 31—32, 57

Ферментативная иммунохроматография 24, 135, 149—159
— — концентрация антител 152—153
— — — конъюгата 153—154
— — остроконечность фронта 152
— — принцип метода 150—152
— — точность 157
Ферментативный иммуносорбционный анализ (ELISA) 8, 131, 172—174, 193—209, 220—239, 369—383. *См. также* Метод ELISA
— иммуноанализ (EMIT-анализ) 36—55, 103—120. *См. также* Анализ EMIT
Фермент-зависимые метки (ФЗМ) 11—12
— — преимущества и недостатки 11
— — чувствительность и универсальность 11—12
Ферментный иммунокомплекс 27
Ферритин 32, 110, 111—113, 173, 188, 300
Флавинадениндинуклеотид (FAD) 15, 16, 18, 19, 69, 74, 97—98
— использование в ИФА в качестве метки 15—16, 69—76
— удаление из гологлюкозооксидазы 98
Флавинмононуклеотид (FMN) 74
Флуоресцентный иммуноанализ с использованием проточно-инжекционной системы 162—170
— — — — — — дихлорфлуоресцеин (ДХФ) 163, 170
— — — — — — конъюгация пероксидазы с антителами 163, 169
— — — — — — окисление лейкодиацетилхлорфлуоресцеина (ЛДАДХФ) 163, 169
— — — — — — оптимизация анализа 164, 165—167
— — — — — — характеристики иммуноанализа 166, 167
Флуориметрический иммуноанализ на основе ингибирования фермента 110—114
Флуориметрия в иммуноферментном анализе 285—296
— — — — использование лазера 293—295
— — — — оборудование 288—289
— — — — применение 289—293
— — — — субстраты 286—288
Флуорогенные субстраты ферментов 17—18, 24, 77—86, 95, 286—287, 289, 292, 294
— — — конъюгаты с лигандом 79—81, 83—86
— — — спектры поглощения конъюгатов 83—85
— — — — флуоресценции конъюгатов 85—86
— — — умбеллиферил-β-D-галактозид 14, 78, 168
Фосфоглюкозоизомераза 21
Фосфонатный необратимый ингибитор ацетилхолинэстеразы 61, 64—65, 67
Фосфофруктокиназа 21

Хориогонадотропин человека (ХГТЧ) 134, 144—148
Хориомаммотропин (ХМТ) 30, 258—262

Цитолизин, иммуноанализ на его основе 127—128
— конъюгат [лиганд — цитолизин] 21—22
— — [определяемое вещество — цитолизин] 126, 127
— — [уабаин — меллитин] 22, 123, 124, 127
— определение дигоксина 22, 123
Цитолизины 128

Щелочная фосфатаза 22, 196, 213
— — из кишечника теленка 196
— — — *E. coli* 304
— — флуориметрическое детектирование 286

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-электрофорез в ПААГ) 341, 343, 348—351, 363
Электрофоретический перенос в сочетании с иммуноферментным анализом (ИФАЭП) 341—363. *См. также* ИФАЭП
— — (электроблотинг) разделенных белков на твердую подложку 341, 342, 343—346, 355—361

Оглавление

Предисловие редактора перевода . . . 5

Глава 1. Введение. Т. Т. Нго, Г. М. Ленхофф . . . 8

Литература . . . 9

Глава 2. Иммуноферментный анализ: общий обзор. Т. Т. Нго . . . 10

Введение . . . 10
Фермент-зависимые метки . . . 11
Преимущества ФЗМ . . . 11
Недостатки ФЗМ . . . 11
Чувствительность и универсальность ферментных меток . . . 11
Иммуноферментный анализ без разделения компонентов (гомогенный анализ) и с их разделением (гетерогенный анализ) . . . 12
Иммуноферментный анализ без разделения компонентов (гомогенный анализ) . . . 13
ИФА без разделения компонентов с использованием в качестве метки ферментов . . . 13
ИФА без разделения компонентов с использованием в качестве метки модуляторов ферментов . . . 14
ИФА без разделения компонентов с использованием в качестве метки простетических групп . . . 15
ИФА без разделения компонентов с использованием в качестве метки флуорогенных субстратов . . . 17
ИФА без разделения компонентов на основе конформационных ограничений метки-апофермента при взаимодействии антител с лигандом . . . 18
ИФА без разделения компонентов с использованием «ферментных каналов» . . . 20
ИФА без разделения компонентов с использованием ферментов, заключенных в липосомы . . . 21
ИФА без разделения компонентов с использованием индикаторных полосок . . . 23
Иммуноферментный анализ с разделением компонентов (гетерогенный анализ) . . . 24
Конкурентный ИФА с разделением компонентов . . . 25
Ингибиторный ИФА с разделением компонентов . . . 25
Сэндвич-ИФА с разделением компонентов . . . 26
ИФА с разделением компонентов, основанный на ферментативной иммунометрии (ИФАИМ) . . . 26
Непрямой ИФА с разделением компонентов . . . 27
ИФА с разделением компонентов, основанный на использовании конъюгатов [фермент — лиганд], маркированных якорной группой . . . 28
ИФА с разделением компонентов, основанный на пространственных затруднениях . . . 29
ИФА с разделением компонентов для определения изоферментов . . . 30
Усиление ферментативных сигналов . . . 31
Заключение . . . 32
Литература . . . 32

Часть I. Иммуноферментный анализ без разделения компонентов (гомогенный анализ) . . . 36

Глава 3. Определение гаптенов с помощью иммуноферментного анализа без разделения компонентов. А. Яклич . . . 36

Введение . . . 36

Принцип анализа . . . 38
Контроль дозировки лекарственных препаратов (токсикологический анализ мочи) . . . 39
Токсикологический анализ сыворотки . . . 41
Контроль лекарственных препаратов . . . 42
Цель . . . 42
Методика анализа . . . 43
Разработка EMIT-методов . . . 43
Конъюгаты гаптенов, обладающих лечебным действием . . . 43
Оптимизация анализа . . . 44
Гентамицин, нетилмицин и сисомицин . . . 45
Тобрамицин, амикацин и канамицин . . . 47
Характеристики анализа . . . 51
Стабильность реагентов . . . 51
Обработка данных . . . 52
Анализ больших партий образцов . . . 53
Альтернативные методы . . . 53
Перспективы метода . . . 54
Краткое содержание . . . 54
Благодарности . . . 55
Литература . . . 55

Глава 4. Модуляторы ферментов как метки для иммуноанализа без разделения компонентов: иммуноанализ с помощью модуляторов ферментов. Т. Т. Нго . . . 57

Введение . . . 57
Принцип иммуноанализа с помощью модуляторов ферментов . . . 58
Материалы и методы . . . 59
Стратегия разработки ИФАМ . . . 59
Получение конъюгатов [модулятор — лиганд] . . . 60
Результаты . . . 61
ИФАМ на основе макромолекулярных ингибиторов . . . 62
ИФАМ на основе низкомолекулярного обратимого ингибитора . . . 64
ИФАМ на основе низкомолекулярного необратимого ингибитора . . . 64
ИФАМ на основе S-липида и S-белка рибонуклеазы . . . 65
Обсуждение . . . 66
Литература . . . 67

Глава 5. Иммуноферментный анализ с применением в качестве метки простетических групп. Т. Т. Нго . . . 69

Введение . . . 69
Общие положения . . . 69
Принцип ИФАПГ . . . 69
Получение апоглюкозооксидазы . . . 70
Получение конъюгатов FAD — Л . . . 70
Синтез флавин-N^6-(6-аминогексил)адениндинуклеотида (аминогексил-FAD) . . . 71
Синтез FAD-теофиллина . . . 71
Синтез конъюгата [FAD — иммуноглобулин G человека] (FAD — IgG) . . . 71
Измерение активности глюкозооксидазы . . . 72
Результаты . . . 72
Восстановление гологлюкозооксидазы из апоглюкозооксидазы и FAD — Л . . . 72
Ингибирующее влияние антител к Л на способность FAD — Л активировать апоглюкозооксидазу . . . 72
Устранение ингибирующего влияния антител на способность FAD — Л активировать апоглюкозооксидазу: конкуренция Л и FAD — Л за антитела к Л . . . 73

ИФАПГ с помощью индикаторных полосок . . . 74
Точность и достоверность . . . 74
Вещества, мешающие определению . . . 74
Обсуждение . . . 75
Краткое содержание . . . 75
Литература . . . 76

Глава 6. Иммуноферментный анализ без разделения компонентов, основанный на использовании в качестве метки флуорогенных субстратов: определение гаптенов и макромолекул. Т. Т. Нго, Р. К. Вонг . . . 77

Введение . . . 77
Общие положения . . . 77
Принцип ИФАФС . . . 77
Материалы и методы . . . 78
Ферменты . . . 78
Синтез карбокси-производных умбеллиферил-β-D-галактозида . . . 78
Синтез конъюгата флуорогенного субстрата фермента с определяемым лигандом (С — Л) . . . 79
Синтез С — Л путем непосредственного связывания β-ККГ с определяемым лигандом, содержащим аминогруппу . . . 80
Непрямое связывание β-ККГ с макромолекулами . . . 80
Стандартные методики проведения ИФАФС . . . 81
Результаты . . . 83
Спектры поглощения конъюгата [флуорогенный субстрат — определяемый лиганд] до и после ферментативного гидролиза . . . 83
Спектры флуоресценции конъюгата [флуорогенный субстрат — определяемый лиганд] до и после ферментативного гидролиза . . . 85
Титрование антител против лиганда с помощью конъюгата [флуорогенный субстрат — определяемый лиганд] . . . 86
Конкуренция за связывание; калибровочные кривые . . . 86
Точность ИФАФС . . . 87
Аналитическое обнаружение и влияние разбавления образцов . . . 89
Достоверность . . . 89
Обсуждение результатов . . . 91
Примечание . . . 95
Литература . . . 95

Глава 7. Иммуноанализ на основе конформационных ограничений, создаваемых для фермент-зависимой метки антителами. Т. Т. Нго, Г. М. Ленхофф . . . 97

Введение . . . 97
Материалы и методы . . . 98
Результаты . . . 98
Обсуждение . . . 101
Литература . . . 102

Глава 8. Определение макромолекул с помощью иммуноферментного анализа без разделения компонентов. Я. Гиббонз . . . 103

Введение . . . 103
Методы анализа с использованием β-галактозидазы и высокомолекулярного субстрата . . . 103
Колориметрический иммуноанализ на основе ингибирования фермента 103
Турбидиметрический иммуноанализ на основе активации фермента 106
Флуориметрический иммуноанализ на основе ингибирования фермента 110
Обсуждение . . . 113
Иммуноанализ на основе «ферментных каналов» . . . 114

Первый фермент в качестве метки . . . 115
Второй фермент в качестве метки . . . 117
Литература . . . 120

Глава 9. Иммуноанализ с помощью ферментов, заключенных в липосомы. У. Дж. Литчфилд, Дж. У. Фрейтаг . . . 122

Введение . . . 122
Методы . . . 123
Обсуждение . . . 124
Примечание . . . 128
Литература . . . 128

Глава 10. Иммуноанализ с применением индикаторных полосок. Д. Дж. Литман . . . 130

Введение . . . 130
Системы генерации сигнала . . . 131
Матрицы для индикаторных полосок . . . 132
Материалы и методы . . . 132
Материалы . . . 132
Методы иммобилизации . . . 133
Получение конъюгата . . . 133
Измерение отражательной способности . . . 134
Методика анализа и состав реагентов . . . 134
Другие методы . . . 135
Индикаторные полоски для качественного анализа с внутренним стандартом . . . 135
Принцип и методика анализа . . . 136
Система внутреннего стандарта . . . 137
Концентрация антител и глюкозооксидазы . . . 137
Кинетика связывания антигена . . . 138
Калибровочные кривые для определения морфия . . . 139
Влияние времени проявления и температуры . . . 140
Помехи со стороны образцов и влияние основных компонентов образцов 141
Воспроизводимость и достоверность анализа . . . 142
Обсуждение . . . 144
Скоростной иммуноанализ с помощью ультразвука . . . 144
Принцип и методика анализа . . . 144
Влияние ультразвука на связывание ХГТЧ с иммобилизованными антителами . . . 145
Сравнительное изучение влияния различных факторов на твердофазное связывание . . . 146
Калибровочная кривая для определения ХГТЧ; клинический анализ 147
Обсуждение . . . 149
Ферментативная иммунохроматография — неинструментальный метод количественного анализа . . . 149
Принцип и методика анализа . . . 150
Остроконечность фронта и краевые эффекты . . . 152
Влияние концентрации антител на аналитический сигнал . . . 152
Влияние концентрации конъюгата . . . 153
Влияние продолжительности инкубации и температуры . . . 154
Анализ цельной крови и влияние основных компонентов образцов 155
Стабильность калибровочной кривой . . . 157
Клинические характеристики . . . 158
Обсуждение . . . 158
Краткое содержание и перспективы . . . 159
Литература . . . 160

Глава 11. Флуоресцентный иммуноферментный анализ без разделения компонентов с использованием проточно-инжекционной системы. Т. Келли . . . 162
Введение . . . 162
Методы . . . 164
Оптимизация анализа . . . 164
Выполнение анализа . . . 164
Результаты . . . 165
Оптимизация анализа . . . 165
Характеристики иммуноанализа . . . 167
Обсуждение . . . 168
Краткое содержание . . . 169
Благодарности . . . 170
Литература . . . 170

Часть II. Иммуноферментный анализ с разделением компонентов (гетерогенный анализ) . . . 172

Глава 12. Иммуноферментный анализ гаптенов и антигенов с разделением компонентов (гетерогенный анализ). Д. К. Стэндифер . . . 172
Введение . . . 172
Методы . . . 174
Конъюгация с индикаторным ферментом . . . 174
Очистка антител . . . 176
Подготовка носителя . . . 177
Результаты . . . 179
Концентрация ферментного конъюгата . . . 179
Чувствительность . . . 181
Иммунные циркулирующие комплексы . . . 182
Обсуждение . . . 184
Литература . . . 190

Глава 13. Иммуноферментный анализ антител. Сеймур П. Халберт и Тсу-Минг Лин . . . 193
Иммобилизация антигена на носителе . . . 195
Требования к чистоте антигена . . . 195
Степень очистки антител, содержащих ферментную метку . . . 195
Методика анализа . . . 196
Обработка результатов анализа . . . 196
Время инкубации . . . 199
Соотнесение с результатами других анализов . . . 199
Фоновая активность . . . 200
Определение антител данного класса . . . 201
Специфичность реакций в методе ELISA . . . 204
Диагностическое значение обнаружения антител методом ELISA . . . 207
Литература . . . 209

Глава 14. Амплифицированный фермент-зависимый иммуносорбционный анализ a-ELISA. Дж. Е. Батлер, Дж. Х. Петерман, Т. Е. Кёртдж . . . 210
I. Введение . . . 210
II. Приготовление реагентов . . . 212
А. Источник антиглобулинов . . . 212
Б. Получение растворимого иммуноферментного комплекса (ИФК) . . . 213
В. Проверка специфичности . . . 216
III. Определение специфических антител в микровариантах метода ELISA . . . 220
А. Адсорбция антигенов на платах для микротитрования . . . 220

Б. Титрование первичных антител . . . 222
В. Добавление реагентов, завершающих анализ . . . 224
Г. Реакция ИФК с субстратом . . . 227
IV. Особенности определения специфических антител с помощью микроварианта метода ELISA . . . 228
А. Зависимость эффективности определения от связывания первичных антител . . . 228
Б. Влияние аффинности и авидности антител . . . 232
В. Регистрация и обработка результатов анализа . . . 235
Г. Определение абсолютных количеств специфических антител . . . 237
V. Другие применения метода a-ELISA . . . 239
А. Анализ распределения антигена на основе метода ELISA . . . 239
Б. Конкурентный иммуноферментный анализ . . . 241
Краткое содержание . . . 242
Литература . . . 242

Глава 15. Ферментативный иммунометрический анализ с применением аффинных колонок. Дж. Уильям Фрейтаг . . . 244
Введение . . . 244
Основы иммунометрического анализа с применением аффинных колонок . . . 245
Постановка эксперимента . . . 246
Результаты и их обсуждение . . . 251
Литература . . . 255

Глава 16. Иммуноферментный анализ с использованием эффекта пространственных затруднений (ИФАПЗ). Альберт Кастро и Нобуо Монджи . . . 257
Введение . . . 257
Методы . . . 258
Система ИФАПЗ для хориомаммотропина (ХМТ) . . . 258
Проведение анализа . . . 259
Система ИФАПЗ для T_4 . . . 260
Результаты . . . 260
Обсуждение результатов . . . 262
Литература . . . 263

Глава 17. Связывание малеимидных производных гаптенов с ферментами для использования в ИФА. Нобуо Монджи, Альберт Кастро . . . 264
Введение . . . 264
Методы . . . 265
Иммуноферментный анализ тироксина . . . 265
Иммуноферментный анализ кортизола . . . 266
Иммуноферментный анализ дигоксина . . . 268
Результаты и обсуждение . . . 270
Литература . . . 274

Глава 18. Иммуноферментный анализ с использованием дополнительно маркированных конъюгатов фермент — лиганд. Т. Т. Нго и Г. М. Ленхофф . . . 275
Введение . . . 275
Принцип метода . . . 275
Материалы и методы . . . 276
Иммобилизация авидина на аминогексил-сефарозе (АН-сефарозе) . . . 277
Синтез *м*-малеимидобензоил-ДНФ-лизина . . . 277
Получение конъюгата [β-галактозидаза — биотин] . . . 277
Модификация конъюгата [биотин — β-галактозидаза] *м*-малеимидобензоил-ДНФ-лизином . . . 277
Ферментативная активность . . . 278

Типичные результаты 278
Получение модельного конъюгата [Л — Ф — Я] 278
Взаимодействие растворимого [Л — Ф — Я] с иммобилизованным рецептором (ИР) 279
Подавление ферментативной активности конъюгата [Л — Ф — Я] при связывании с антителами 280
Стандартная кривая: конкуренция между Л и [Л — Ф — Я] за связывание с Ат 280
Влияние эндогенного биотина 281
Обсуждение 281
Отличительные особенности метода 281
Возможности применения и модификации 282
Ограничения 283
Краткое содержание 283
Литература 283

Глава 19. Флуориметрические методы в иммуноферментном анализе. Кристин Милби 285
Введение 285
Субстраты 286
Оборудование 288
Применение 289
Иммуноферментный анализ с применением лазерной флуориметрии 293
Заключение 295
Литература 296

Глава 20. Радиально-распределительный иммуноферментный анализ. Джозеф Л. Джигель 298
Введение 298
Материалы и методы 300
Оборудование 300
Получение реагентов 303
Приготовление фильтров, покрытых антителами 303
Получение ферментных конъюгатов 304
Приготовление раствора для отмывки, содержащего субстрат . . . 305
Приготовление калибровочных стандартов 305
Методика определения 305
Результаты и обсуждение 306
Последовательный анализ: дигоксин 306
Конкурентный анализ: тироксин 309
Сэндвич-анализ: ферритин 311
Обсуждение 316
Литература 316

Глава 21. Разработка методов иммунохимического анализа изоферментов сердца. Р. Викс, М. Усатеги-Гомес 317
Введение 317
Сведения о лактатдегидрогеназе 317
Первые иммунохимические методы определения ЛДГ-1 318
Разработка иммунохимического анализа ЛДГ-1 318
Клинические исследования 323
Свойства креатинкиназы 326
Разработка простого и быстрого иммунохимического метода определения изофермента КК-МВ (тест Isomune[R] CK) 327
Клинические испытания теста Isomune CK[R] 334
Заключение 337
Литература 338

Глава 22. Электрофоретический перенос в сочетании с иммуноферментным анализом. В. К. В. Тсанг, Д. Е. Берс, К. Хэнкок 341
Введение 341
Методы 343
А. Растворы 343
Б. Подготовительные операции на стадии ДСН-электрофореза в ПААГ 343
В. Методика электрофоретического переноса с последующим ИФА (ИФАЭП) 343
Г. Фотографирование и хранение блотов 347
Д. Денситометрирование 347
Типичные результаты 348
А. Различные препараты антигена/один препарат антител 348
Б. Один препарат антигена/различные препараты антител 348
В. Пределы чувствительности метода 351
Обсуждение 352
Антигенные свойства белков после переноса 852
Особенности применения моноклональных антител 353
Типы биологических молекул, которые можно анализировать методом электропереноса 354
Матрицы для блота 355
Буферные растворы и электрические параметры при электропереносе 355
Общие положения, касающиеся выбора буферной системы и электрических параметров при переносе 357
Неспецифические взаимодействия и блокирующие их реагенты . . 359
Ферментные конъюгаты и субстраты 361
Заключение 362
Литература 363

Глава 23. Иммуноферментная диагностика тропических заболеваний, вызываемых паразитами. Д. де Савиньи, Ф. Спейсер 367
Введение 367
Часть А. Иммуноферментный анализ антител 368
Методы 369
Типичные результаты 370
Обсуждение 375
Часть Б. Иммуноферментный анализ паразитарных антигенов . . . 378
Методы 379
Типичные результаты 381
Обсуждение 382
Заключение 383
Благодарности 383
Литература 384

Глава 24. Использование моноклональных антител в ферментативном иммунометрическом анализе. С. И. Шимицу, Д. С. Кабакофф, Е. Д. Севьер 385
Введение 385
Преимущества использования моноклональных антител 385
Ферментативный иммунометрический анализ с использованием моноклональных антител 386
Линейный ферментативный иммунометрический анализ 390
Методы 390
Калибровка 391
Расширение диапазона тестирования при работе на двух длинах волн 392
Двухцентровая избирательность 392
Визуальный ферментативный иммунометрический анализ 394
Получение бифункциональных моноклональных антител 396
Моноклональные антитела к раковым антигенам 397

Краткое содержание . . . 399
Литература . . . 399

Глава 25. Определение активности пероксидазы методом Нго — Ленхоффа (в системе МБТГ — ДМАБК). В. Д. Джиохиган . . . 400
Введение . . . 400
Методы . . . 400
Вещества, мешающие определению . . . 404
Обсуждение . . . 402
Литература . . . 409
411

Глава 26. Иммунопероксидазные методы с использованием системы авидин — биотин. Су-Минг Хсу . . . 413
Введение . . . 413
Применение методов на основе авидин-биотиновой системы . . . 414
Принципы, лежащие в основе применения авидин-биотиновой системы 415
Анализ тканевых срезов с помощью МАБ-метода . . . 415
Анализ тканевых срезов с помощью АБМ-метода . . . 416
Основы метода АБК . . . 417
Анализ тканевых срезов с помощью иммунопероксидазного АБК-метода 418
Преимущества авидин-биотиновых систем анализа . . . 419
Применение АБК в системах анализа, отличных от иммуногистохимической . . . 420
Фоновое и неспецифическое окрашивание . . . 420
Биотинилирование белков . . . 421
Заключение . . . 421
Литература . . . 422
Предметный указатель . . . 428

Список замеченных опечаток

	Страница	Напечатано	Следует читать
1.	28, рис. 2-14	HP	ИР
2.	82, рис. 6-5	$CH_2OC(=NH)-(CH_2)_4-COCH_3(=NH)$	$CH_3OC(=NH)-(CH_2)_4-COCH_3(=NH)$